



**Uniwersytet Warszawski**  
**Wydział Chemii**

**Marcin Maćkiewicz**

**Środowiskowo-czułe mikrożele na bazie  
*N*-izopropyloukryloamidu. Synteza,  
właściwości i zastosowanie**

Praca doktorska wykonana  
w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrod  
Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

**Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Stojek**

WARSZAWA 2016



*Dziękuję*

*Profesorowi dr. hab. Zbigniewowi Stojkowi  
za opiekę naukową w trakcie wykonywania pracy*

*Dziękuję*

*Dr hab. Annie Nowickiej  
za pierwsze kroki w badaniach naukowych*

*Dziękuję*

*Dr. Marcinowi Karbarzowi  
za nieocenioną pomoc oraz cenne uwagi i sugestie*

*Dziękuję*

*Koleżankom i Kolegom  
z Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrody  
za pomoc i stworzenie miłej atmosfery*



*Niniejszą pracę dedykuję  
moim Ś.P. Rodzicom, Rodzinie oraz Dorocie  
za bezgraniczną pomoc i wiarę we mnie.*



Praca ta była częściowo finansowana przez Grant NCN 2014/15/N/ST5/02937





## SPIS TREŚCI

<b>1. WSTĘP I CELE PRACY .....</b>	<b>13</b>
------------------------------------	-----------

### *-Część literaturowa-*

<b>2. POLIMERY CZUŁE NA WARUNKI ŚRODOWISKA.....</b>	<b>17</b>
---	-----------

2.1. INTELIGENTNE POLIMERY ORAZ ZJAWISKO PRZEJŚCIA FAZOWEGO .....	18
2.2. POLI(NIPA) – INTELIGENTNY POLIMER .....	21
2.3. WPLYW CZYNNIKÓW ZEWNĘTRZNYCH NA TEMPERATURĘ LCST POLIMERU PNIPA .....	23
2.3.1. WPLYW MASY CZĄSTECZKOWEJ .....	24
2.3.2. WPLYW SOLI.....	24
2.3.3. WPLYW TYPU ROZPUSZCZALNIKA .....	26
2.4. TERMODYNAMIKA PRZEJŚCIA FAZOWEGO PNIPA .....	27
2.5. TEORIA FLORY-HUGGinsa .....	28

<b>3. ŻELE.....</b>	<b>31</b>
---------------------	-----------

3.1. PRZEJŚCIE FAZOWE HYDROŻELI .....	32
3.2. HYDROŻELE PNIPA.....	36
3.3. PĘCZNIE NIE HYDROŻELI PNIPA .....	37
3.4. MECHANIZM PĘCZNIE NIE HYDROŻELI ORAZ JEGO SZYBKOSĆ .....	41

<b>4. MIKROŻELE .....</b>	<b>47</b>
---------------------------	-----------

4.1. KLASYFIKACJA MIKROŻELI.....	48
4.1.1. KLASYFIKACJA ZE WZGLĘDU NA RODZAJ USIECIEWANIA .....	48
4.1.2. KLASYFIKACJA MIKROŻELI ZE WZGLĘDU NA CZUŁOŚĆ NA BODŹCE ŚRODOWISKOWE ...	49
4.2. MIKROŻELE PNIPA .....	50
4.3. SYNTEZA MIKROŻELI .....	53
4.3.1. POLIMERYZACJA EMULSYJNA .....	55
4.4. STABILNOŚĆ KOLOIDALNA MIKROŻELI .....	59
4.5. METODY UŻYWANE DO CHARAKTERYZACJI MIKROŻELI .....	59
4.6. CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE WYWOŁUJĄCE PRZEJŚCIA FAZOWE MIKROŻELI NA BAZIE PNIPA .....	63
4.6.1. WPLYW TEMPERATURY .....	64
4.6.2. WPLYW PH.....	65
4.6.3. WPLYW POTENCJAŁU REDOKS .....	66
4.6.4. WPLYW ROZPUSZCZALNIKA .....	66
4.6.5. WPLYW SIŁY JONOWEJ .....	67
4.7. KOMPOZYTOWE/HYBRYDOWE MIKROŻELE .....	70
4.7.1. POLIMERY PRZEWODZĄCE .....	71

<b>5. ZASTOSOWANIA MIKROŻELI.....</b>	<b>75</b>
5.1. MIKROŻELE JAKO NOŚNIKI LEKÓW .....	78
5.2. MAGAZYNOWANIE ORAZ UWALNIANIE LEKÓW .....	80
5.2.1. MAGAZYNOWANIE LEKÓW W MIKROŻELACH .....	81
5.2.2. UWALNIANIE LEKÓW Z MIKROŻELI.....	81

### *-Część eksperymentalna-*

<b>6. APARATURA I ODCZYNNIKI .....</b>	<b>87</b>
6.1. APARATURA.....	87
6.2. ODCZYNNIKI .....	89
<b>7. TECHNIKI BADAWCZE.....</b>	<b>91</b>
7.1. WOLTAMPEROMETRIA CYKLICZNA .....	91
7.2. DYNAMICZNE ROZPRASZANIE ŚWIATŁA I POTENCJAŁ ZETA .....	92
7.3. TRANSMISYJNA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA .....	97
7.4. SKANINGOWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA.....	98
7.5. SPEKTROSKOPIA UV-Vis .....	100
<b>8. SYNTEZA MIKROŻELI.....</b>	<b>103</b>
8.1. SYNTEZA MIKROŻELI PNIPA W NIEOBECNOŚCI I OBECNOŚCI CZYNNIKA SIECIUJĄCEGO BIS .....	103
8.2. SYNTEZA MIKROKOMPOZYTU P(NIPA-BIS)/PANI .....	105
8.3. SYNTEZA MIKROŻELI P(NIPA-BIS-ACORN) .....	106
8.4. SYNTEZA MIKROŻELI P(NIPA-BISS) .....	107
<b>9. MIKROŻEL PNIPA ZMODYFIKOWANY POCHODNĄ L-ORNITYNY .....</b>	<b>109</b>
9.1. BADANIE WPŁYWU pH, TEMPERATURY, OBECNOŚCI JONÓW $\text{Cu}^{2+}$ I $\text{Ca}^{2+}$ ORAZ ZAWARTOŚCI <i>N</i> - $\delta$ -AKRYLOILOORNITYNY NA STAN NAPEŁCZENIA MIKROŻELI .....	110
9.1.1. WPŁYW ZAWARTOŚCI <i>N</i> - $\delta$ -AKRYLOILOORNITYNY NA STAN NAPEŁCZENIA MIKROŻELI.....	110
9.1.2. MORFOLOGIA MIKROŻELI.....	112
9.1.3. WPŁYW pH NA STAN NAPEŁCZENIA MIKROŻELI .....	113
9.1.4. WPŁYW OBECNOŚCI JONÓW METALI CIĘŻKICH NA STAN NAPEŁCZENIA MIKROŻELI ...	120
9.2. PODSUMOWANIE .....	122
<b>10. KOMPOZYT MIKROŻELU PNIPA Z POLIANILINĄ.....</b>	<b>125</b>
10.1. MORFOLOGIA MIKROKOMPOZYTU.....	125
10.2. BADANIE PRZEJŚĆ FAZOWYCH.....	128
10.3. WŁAŚCIWOŚCI ELEKTROCHEMICZNE MIKROKOMPOZYTU.....	129
10.4. SZYBKOŚĆ PRZEJŚCIA FAZOWEGO MIKROKOMPOZYTU .....	133

10.5.	PODSUMOWANIE.....	134
<b>11.</b>	<b>MIKROŻEL PNIPA ZAWIERAJĄCY MOSTKI DISIARCZKOWE JAKO NOŚNIK LEKU. ....</b>	<b>137</b>
11.1.	MORFOLOGIA MIKROŻELI .....	138
11.2.	WPLYW ZAWARTOŚCI $N,N'$ -BIS(AKRYLOILO)CYSTYNY NA STOPIEŃ NAPEŁCZENIA MIKROŻELI .....	139
11.3.	WPLYW SIŁY JONOWEJ NA STOPIEŃ NAPEŁCZENIA ORAZ STABILNOŚĆ MIKROŻELI .....	141
11.4.	WPLYW PH NA STOPIEŃ NAPEŁCZENIA MIKROŻELI .....	144
11.5.	DEGRADACJA MIKROŻELI .....	146
11.6.	UWALNIANIE DOKSORUBICYNY Z MIKROŻELU .....	150
11.6.1.	UMIESZCZENIE DOKSORUBICYNY W MIKROŻELU .....	151
11.6.2.	BADANIE UWALNIANIA DOKSORUBICYNY Z MIKROŻELU NA SKUTEK JEGO DEGRADACJI .....	153
11.7.	TESTY ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK IN VITRO .....	155
11.7.1.	HODOWLA KOMÓRKOWA.....	155
11.7.2.	TESTY CYTOTOKSYCZNOŚCI .....	155
11.8.	PODSUMOWANIE.....	157
<b>12.</b>	<b>STRESZCZENIE PRACY .....</b>	<b>159</b>
<b>13.</b>	<b>STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM .....</b>	<b>165</b>
<b>14.</b>	<b>SPIS PUBLIKACJI POWSTAŁYCH W TRAKCIE REALIZACJI PRACY DOKTORSKIEJ .....</b>	<b>169</b>
<b>15.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>171</b>



## 1. Wstęp i cele pracy

Intensywny rozwój nauki i techniki wymaga nieustannego poszukiwania nowych materiałów wykazujących coraz lepsze właściwości. Obecnie obserwowany jest wzrost zainteresowania polimerowymi mikrożelami dzięki ich unikalnym właściwościom fizykochemicznym. Żele to polimery o usieciowanej budowie, które pęcznieją w rozpuszczalniku. Mikrożele są podobne do makrożeli, ale mają koloidalne rozmiary i w związku z tym różnią się znacznie właściwościami fizykochemicznymi. Hydrożele absorbują dużą ilość wody i są biogodne. Hydrożele łączą w sobie cechy charakterystyczne dla cieczy i ciał stałych; małe cząsteczki mogą swobodnie dyfundować wewnątrz całej objętości żeli. Makrożele i mikrożele mogą występować w dwóch różnych stanach: spęczniałym i skurczonym, a przejście z jednego stanu w drugi nazywa się objętościowym przejściem fazowym (Volume Phase Transition – VPT). To odwracalne przejście fazowe następuje w odpowiedzi na zmiany warunków otoczenia takich jak: temperatura, pH, siła jonowa, obecność niektórych jonów, ciśnienie, skład rozpuszczalnika i promieniowanie elektromagnetyczne. W przeciwieństwie do makroskopowych żeli, mikrożele mają relatywnie większy obszar powierzchni dostępny do oddziaływania z substancjami chemicznymi, znajdującymi się w otoczeniu mikrożelu. Dodatkowo ich małe rozmiary powodują, że znacznie szybciej reagują na zmiany bodźców środowiskowych oraz mogą być podawane do organizmu.

Obiektem moich badań były mikrożele oparte o czuły na temperaturę poli(*N*-izopropylakryloamid) (pNIPA). Usieciowane hydrożele pNIPA wykazują VPT przy temperaturze powyżej 32°C. W temperaturze poniżej 32°C żele te występują w stanie spęczniałym (bogatym w rozpuszczalnik), natomiast powyżej tej temperatury występują w stanie skurczonym (zdehydratowanym, bogatym w polimer) o ograniczonej dostępności grup funkcyjnych. Dostępność grup funkcyjnych mikrożeli na bazie pNIPA może zwiększać się lub zmniejszać zależnie od temperatury czy pH, co ma wpływ na wiązanie i uwalnianie substancji związanych w mikrożelu. Mikrożele są swojego rodzaju zbiornikiem/rezerwuarem do magazynowania związków chemicznych, w tym farmaceutyków. Małe ich rozmiary powodują, że szybko reagują na czynniki zewnętrzne i szybko uwalniają substancje czynne. Dzięki dużej powierzchni właściwej

mikrożeli, szybkiej odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, możliwości kontrolowania ich rozmiarów oraz dzięki możliwości magazynowania biomolekuł we wnętrzu swojej sieci znalazły one zastosowanie jako systemy dostarczania leków. Dodatkowo, funkcjonalizacja mikrożeli spowodowała, że cieszą się one coraz większym zainteresowaniem w medycynie, farmaceutyce, biochemii i ogólnie nanotechnologii. Mikrożele znalazły zastosowanie m.in. jako sensory, katalizatory i urządzenia optyczne.

Głównym celem moich badań była synteza i charakterystyka nowych, środowiskowo-czułych mikrożeli, poprzez wprowadzenie do nich nowych grup funkcyjnych i innych obiektów. Moim pierwszym zdefiniowanym zadaniem było otrzymanie mikrożelu czułego na temperaturę i pH, o właściwościach amfolytycznych i sorpcyjnych poprzez wprowadzenie do mikrożelu grup aminokwasowych. Wprowadzenie ugrupowań  $\alpha$ -aminokwasowych do sieci mikrożelu pNIPA powinno umożliwić kontrolę ilości oraz znaku ładunku w sieci polimerowej poprzez zmianę pH i nadać mikrożelowi, oprócz typowej dla polimeru pNIPA czułości na temperaturę, także czułości na pH. Ponadto wiedząc, że ornityna tworzy kompleksy z niektórymi metalami, oczekiwałem, że mikrożele będą także czułe na obecność wybranych jonów metali. Kolejnym celem było zweryfikowanie wpływu zawartości aminokwasu w sieci polimerowej mikrożeli na ich morfologię, rozmiar, temperaturę przejścia fazowego oraz czułość na pH i obecność jonów metali.

Zaplanowałem również wprowadzić do mikrożelu pNIPA polimer przewodzący polianilinę (PANI). Ideą było stworzenie prostego układu umożliwiającego wytworzenie materiału kompozytowego, który będzie posiadał właściwości typowe dla obu komponentów, czyli czułość na temperaturę typową dla mikrożelu pNIPA oraz elektroaktywność i przewodność typową dla polianiliny. Do realizacji powyższych zadań trzeba było wybrać właściwą metodę syntezy. Zaproponowałem m.in. polimeryzację międzyfazową/dwufazową.

Ostatnim, aplikacyjnym celem było stworzenie mikrożelowego nośnika leków. Moim zamiarem była synteza mikrożelu, który w odpowiednich warunkach ulegnie degradacji i w ten sposób uwolni umieszczony w nim wcześniej lek w żądanym miejscu. W tym celu postanowiłem użyć w syntezie diakrylową pochodną cystyny. Zadaniem tego monomeru było pełnienie funkcji czynnika sieciującego oraz nadanie

sieci polimerowej własności degradowalności. Występujące mostki siarczkowe w pochodnej cystyny powinny pękać w wyniku działania występującego w ludzkim organizmie glutationu. Ponadto oczekiwałem, że w obecności grup karboksylowych aminokwasu poprawi się stabilność mikrożeli w warunkach fizjologicznych i dodatkowo uzyskają one czułość na zmiany pH oraz zdolność do wiązania leku przeciwnowotworowego (doksorubicyny).





## 2. Polimery czułe na warunki środowiska

Polimer jest to cząsteczka składająca się z co najmniej kilkuset powtarzających się i połączonych kowalencyjnie jednostek zwanych monomerami. Polimery otrzymywane z jednego monomeru nazywa się homopolimerami, zaś polimery zbudowane z wielu różnych bloków, pochodzących od kilku różnych monomerów, nazywa się kopolimerami. Polimery otrzymuje się w wyniku reakcji polimeryzacji, która składa się z czterech etapów:

1. Inicjacja
2. Propagacja
3. Terminacja
4. Przeniesienie łańcucha

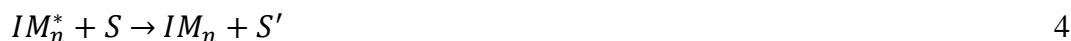
W pierwszym etapie rozpad inicjatora generuje powstanie centrum aktywnego ( $I$ ) (rodnik, anion lub kation) (patrz równanie 1). Aktywna forma inicjatora reaguje z monomerem ( $M$ ) prowadząc do powstawania aktywnej formy monomeru (patrz równanie 2).



Od tego momentu następuje proces propagacji, czyli wzrost łańcucha polimeru. Aktywna forma monomeru przyłącza kolejną cząsteczkę monomeru prowadząc do otrzymania coraz dłuższego łańcucha polimerowego. Wszystkie etapy przyłączania kolejnych monomerów następują bardzo szybko. Następnie centrum aktywne zostaje przeniesione na ostatni monomer w łańcuchu polimerowym (patrz równanie 3).



W trzecim etapie proces wzrostu łańcucha zostaje zatrzymany poprzez przyłączenie do polimeru czynnika terminującego polimeryzację ( $S$  – Stopera), centrum aktywne ulega dezaktywacji (patrz równanie 4). W ostatnim etapie centrum aktywne zostaje przeniesione na inną molekułę ( $N$ ), na przykład rozpuszczalnik, monomer, inicjator, polimer itp. (patrz równanie 5).



W zależności od rodzaju inicjatora polimeryzację można podzielić na polimeryzację rodnikową i jonową (anionową i kationową). W przypadku polimeryzacji rodnikowej inicjatorem reakcji są rodniki. Najczęściej używanymi inicjatorami są nadtlenek wodoru, nadsiarczany potasu, sodu i amonu oraz nadtlenek benzoilu [1].

W polimeryzacji jonowej centrami aktywnymi propagacji są aniony i kationy. W procesie polimeryzacji kationowej inicjatorami polimeryzacji mogą być kwasy protonowe, np. HI, oraz kwasy Lewisa, np.  $AlCl_3$ ,  $BF_3$ ,  $ZnCl_2$  i  $SnCl_4$ . W polimeryzacji anionowej inicjatorami są najczęściej metale alkaliczne (Li, Na, K, itp.). Polimeryzacja anionowa nazywana jest także polimeryzacją „żyjącą” z powodu braku etapu terminacji oraz etapu przeniesienia, w przeciwieństwie do polimeryzacji rodnikowej [1].

Polimery można także otrzymać na drodze polikondensacji. Polikondensacja jest procesem stopniowego tworzenia polimeru. W procesie tym związki wielofunkcyjne reagują ze sobą tworząc polimer z jednoczesnym powstawaniem niskocząsteczkowych molekuł, takich jak woda, alkohol i wodór.

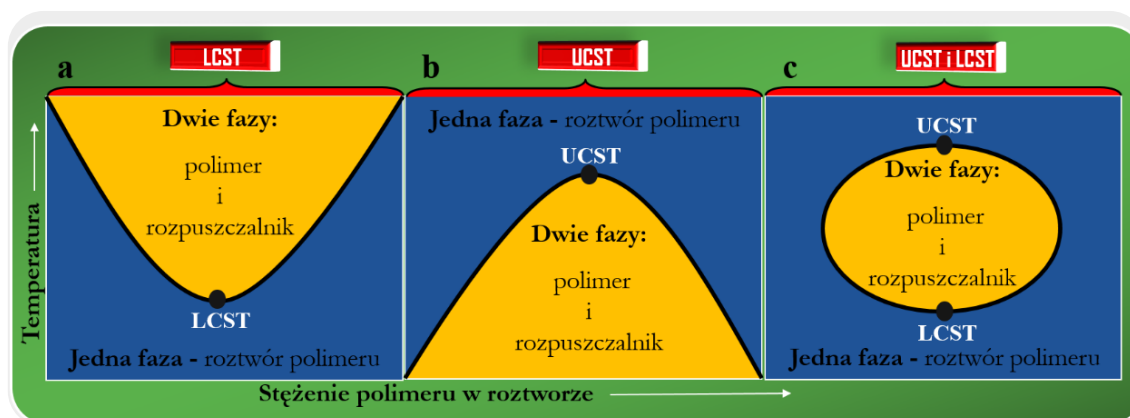
## 2.1. Inteligentne polimery oraz zjawisko przejścia fazowego

Inteligentne polimery to materiały, które reagując na zewnętrzne bodźce, takie jak temperatura, pH, siła jonowa, pole elektryczne, światło i in., mogą w sposób odwracalny zmieniać swoją konformację i związane z nią właściwości [2-5].

Inteligentne polimery mogą występować jako trwale lub odwracalnie usieciowane hydrożele, w tym makro- i mikro-żele, micelle oraz roztwory polimerowe.

W układach wrażliwych na bodźce, najczęściej stosowanymi inteligentnymi polimerami są polimery czułe na temperaturę. Tymi polimerami zazwyczaj są poli(alkiloakryloamidy) [6,7]. Polimery te używane są do celów medycznych, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Roztwory polimerów termo-czułych posiadają unikalną krytyczną temperaturę rozpuszczalności. Polimery te ulegają nagłej, odwracalnej przemianie fazowej w tzw. krytycznej temperaturze rozpuszczalności (Critical Solution Temperature – CST). Powyższa przemiana fazowa objawia się rozdzieleniem faz. Można wyróżnić tzw. dolną oraz górną temperaturę rozpuszczalności [8]. Jeżeli dla wodnego roztworu termo-czułego polimeru, w temperaturze poniżej temperatury krytycznej, występuje nieograniczona mieszalność, natomiast podczas ogrzewania układu, w temperaturze powyżej temperatury krytycznej, następuje rozdzielenie fazowe (polimer staje się nierozpuszczalny i strąca się), wówczas temperatura krytyczna, przy której następuje rozdzielenie faz, nazywana jest dolną krytyczną temperaturą rozpuszczalności polimeru (LCST) [9]. Natomiast, jeżeli w temperaturze powyżej temperatury krytycznej występuje nieograniczona mieszalność polimeru z wodą i rozdzielenie faz występuje podczas chłodzenia układu, tj. poniżej temperatury krytycznej to mamy do czynienia z górną krytyczną temperaturą rozpuszczalności (UCST) [10]. Dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności (LCST) odpowiada górnemu obszarowi ograniczonej mieszalności, zaś górna krytyczna temperatura rozpuszczalności (UCST) odpowiada dolnemu obszarowi ograniczonej mieszalności. Znane są także polimery, które wykazują jednocześnie zarówno dolną (LCST) jak i górną (UCST) temperaturę rozpuszczalności, odpowiednio z górnym oraz dolnym obszarem ograniczonej mieszalności [11]. Diagram fazowy ciecz-ciecz dwuskładnikowego roztworu polimeru, przy stałym ciśnieniu, określa się przez wykreślenie temperatury, przy której następuje rozdzielenie faz, w funkcji całkowitego stężenia polimeru. Rysunek 1 przedstawia typowe krzywe zależności temperatury zmętnienia w funkcji składu, czyli diagramy fazowe dla układów czułych na temperaturę, wykazujących dolną (patrz rysunek 1a), górną (patrz rysunek 1b) oraz zarówno dolną i górną temperaturę rozpuszczalności (patrz rysunek 1c). Diagram fazowy określa kompozycję polimeru, który wytrąca się przy różnych wartościach

temperatury, ale można go również interpretować jako równowagowy stopień spęczenia układu polimer - rozpuszczalnik w funkcji temperatury.



**Rysunek 1.** Diagram fazowy wodnego roztworu polimeru o (a) górnym obszarze ograniczonej mieszalności lub dolnej krytycznej temperaturze rozpuszczalności (LCST), (b) dolnym obszarze ograniczonej mieszalności lub górnej krytycznej temperaturze rozpuszczalności (UCST) oraz (c) o jednocześnie górnej i dolnej krytycznej temperaturze rozpuszczalności. Czarne punkty wyznaczają punkty krytyczne.

Polimery, wykazujące górny obszar ograniczonej mieszalności, mają obszar dwufazowy powyżej krzywej, a jednofazowy – poniżej. Innymi słowy, krzywa o dodatnim nachyleniu wskazuje, że polimer wytrąca się wraz ze wzrostem temperatury. Roztwór polimeru jest homogeniczny w niskiej temperaturze, natomiast rozdzielenie faz pojawia się, gdy temperatura przekroczy krytyczną wartość temperatury mieszaniny [12]. Widoczne na diagramie fazowym (znanym również, jako krzywa temperatury mętnienia) minimum oznacza skrajną temperaturę, przy której następuje rozdzielenie faz [13]. Natomiast dla polimerów wykazujących dolny obszar ograniczonej mieszalności na krzywej można zauważyć dwa obszary fazowe: poniżej krzywej znajduje się obszar dwufazowy, zaś powyżej krzywej obszar jednofazowy. W tym przypadku krzywa posiada nachylenie ujemne i polimer wytrąca się wraz ze zmniejszaniem temperatury. Roztwór jest homogeniczny w wysokiej temperaturze, natomiast rozdzielenie faz występuje w górnej krytycznej temperaturze rozpuszczalności, UCST, która na diagramie wyznaczona jest przez maksimum [9]. W przypadku polimerów wykazujących zarówno temperaturę UCST, jak i LCST na krzywej występuje jednocześnie minimum oraz maksimum. W temperaturach poniżej minimum (LCST) oraz powyżej maksimum (UCST) polimer jest całkowicie

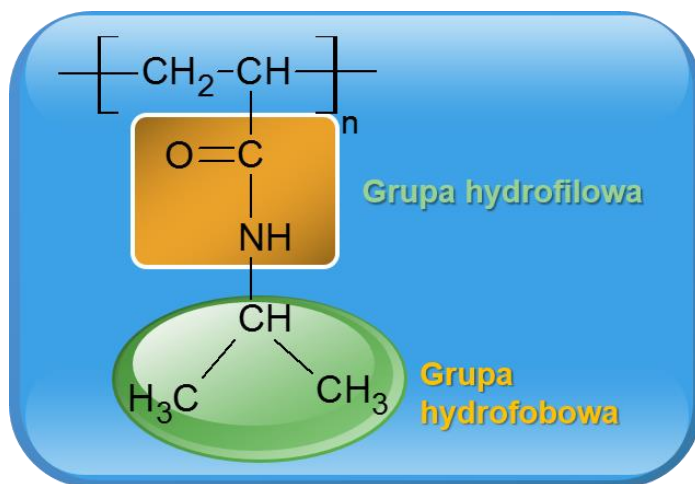
rozpuszczony w roztworze i mamy do czynienia z jedną fazą. Natomiast w określonym zakresie temperatur, pomiędzy LCST oraz UCST, polimer staje się nierozpuszczalny, wytrąca się i występują dwie fazy. Przejście fazowe czułych na temperaturę polimerów lub ich kopolimerów, zależnie od ich rodzaju, może zachodzić w dolnej, górnej lub dolnej i jednocześnie górnej krytycznej temperaturze rozpuszczalności. Zmiany, jakie zachodzą podczas przejścia fazowego, opiszę dokładniej na przykładzie polimeru pNIPA w rozdziale 2.2.

## **2.2. Poli(NIPA) – inteligentny polimer**

Poli(*N*-izopropylakryloamid) jest polimerem tworzącym termo-czułe hydrożele. Do tego celu należy polimer usieciować. Poniższy rozdział opisuje wyjątkowe właściwości polimeru pNIPA, związane z jego czułością na temperaturę.

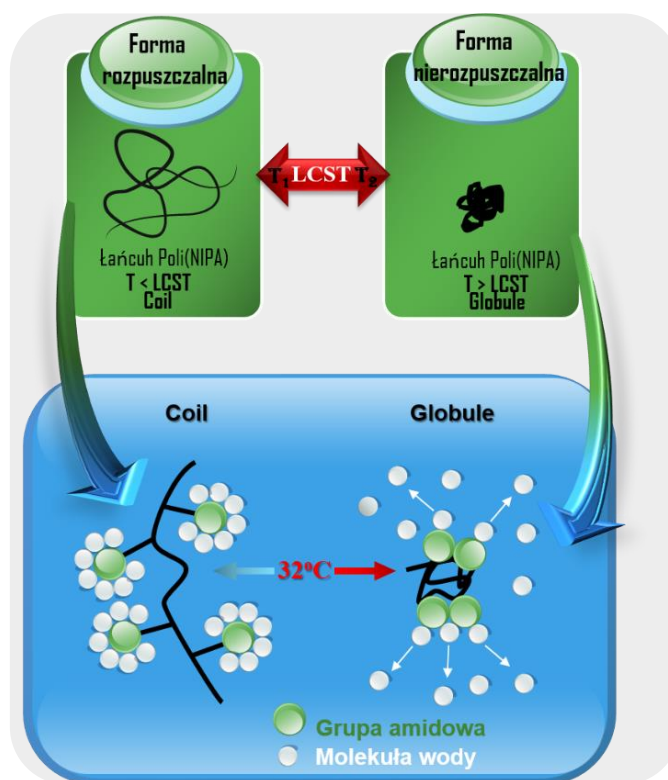
Polimer pNIPA pierwszy raz zsyntezowano w 1950 r [14]. Jako jedyny z grupy alkiloakryloamidów wykazuje przejście fazowe w temperaturze zbliżonej do temperatury ludzkiego ciała, tj. w ok. 32°C. Jest to temperatura LCST [2]. Na poziomie molekularnym przejściem fazowym pNIPA oraz innych czułych na temperaturę polimerów jest przemiana uwodnionego kłębka statystycznego/wstęgi (forma „coil”) w hydrofobową globulę (forma „globule”) [15]. Za takie zachowanie się roztworu polimeru w rozpuszczalniku odpowiedzialne są oddziaływania polimer-rozpuszczalnik, polimer-polimer oraz rozpuszczalnik-rozpuszczalnik. Główną rolę w przemianie odgrywają zmiany w wiązaniach wodorowych oraz oddziaływaniach hydrofobowych [16].

Poniżej temperatury LCST następuje hydratacja polimeru pNIPA i występuje on wtedy w konformacji napęczniałej, czyli konformacji kłębka statystycznego. Powyżej LCST polimer ulega dehydratacji i przyjmuje strukturę pofałdowaną, globularną. Strukturę pNIPA przedstawiłem na rysunku 2.



**Rysunek 2.** Budowa cząsteczki poli(*N*-izopropylakryloamidu) czulej na temperaturę oraz identyfikacja jej hydrofilowych i hydrofobowych grup.

Czułość polimeru na temperaturę jest konsekwencją obecności głównego hydrofobowego szkieletu węglowego oraz obecnych w każdej jednostce monomerycznej dwóch grup: hydrofobowej (izopropylowej) i hydrofilowej (amidowej). W roztworze wodnym, poniżej temperatury LCST, polimer jest solwatowany przez cząsteczki wody. Tworzą się wiązania wodorowe pomiędzy grupami amidowymi łańcucha polimerowego i cząsteczkami wody. Cząsteczki rozpuszczalnika, znajdujące się w pobliżu grup hydrofobowych, tworzą dobrze uporządkowaną strukturę, zwaną klatką, co wpływa na utrudnienie bezpośredniego kontaktu pomiędzy grupami hydrofobowymi. Jest to tzw. „efekt hydrofobowy” [17]. Ostatecznie w niskiej temperaturze oddziaływania polimer-rozpuszczalnik są silniejsze niż oddziaływania polimer-polimer; polimer pNIPA jest rozpuszczony w wodzie i występuje w postaci kłęбка statystycznego (patrz rysunek 3). Ze wzrostem temperatury stopień uporządkowania molekuł wody maleje, następuje zrywanie wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody i grupami N-H lub C=O polimeru a siła oddziaływań hydrofobowych wzrasta [13]. Po przekroczeniu temperatury LCST oddziaływania polimer-polimer stają się silniejsze niż oddziaływania polimer-rozpuszczalnik, co prowadzi do wytrącenia polimeru z roztworu. Następuje rozdzielenie faz i zachodzi zwinięcie łańcucha polimeru w hydrofobową globulę.



**Rysunek 3.** Indukowane temperaturą przejście fazowe polimeru pNIPAA z kłębka statystycznego (coil) w globulę. Rysunek przedstawia uporządkowanie cząsteczek wody wokół polimeru pNIPAA w temperaturach poniżej LCST, a następnie ich przegrupowanie podczas przejścia fazowego. Polimer jest solwotowany dzięki tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody i grupami amidowymi polimeru pNIPAA. W temperaturach powyżej LCST, wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczkami wody i resztami amidowymi ulegają zerwaniu i pojawia się uwalnianie wody z polimeru.

### 2.3. Wpływ czynników zewnętrznych na temperaturę LCST polimeru pNIPAA

Temperatura LCST polimeru pNIPAA w roztworze wodnym wynosi ok. 32°C, jednak jej wartość może ulec zmianie. Zależy to od takich czynników, jak: masa cząsteczkowa i stężenie polimeru, pH roztworu, obecność soli, rodzaj soli oraz jej stężenie [18,19]. Ponadto temperatura LCST polimerów z grupy *N*-alkiloakryloamidów zależy od długości bocznego łańcucha alkilowego; zmniejsza się wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Przykładowo zmniejsza się w sekwencji grup: propylowa > heksylowa > oktylowa.

### 2.3.1. Wpływ masy cząsteczkowej

Opinie naukowców na temat wpływu masy cząsteczkowej polimeru pNIPA na jego temperaturę LCST są podzielone. Schild oraz Tirrell jako pierwsi zauważyli, że na wartość temperatury LCST polimeru pNIPA ma wpływ jego masa cząsteczkowa. Temperatura LCST wzrasta o ok. 2°C, gdy masa cząsteczkowa ulegnie zmniejszeniu z  $1.6 \cdot 10^5$  do  $5.4 \cdot 10^3$  Da [19]. Natomiast Kubota oraz współpracownicy stwierdzili, że LCST pNIPA zależy od masy cząsteczkowej, ale jedynie dla stężenia polimeru z zakresu od 0.01 do 1% wag [20]. Furyk oraz współpracownicy, opierając się na wynikach eksperymentalnych, zauważyli, że na LCST polimerów pNIPA o dużej masie cząsteczkowej zmiany masy cząsteczkowej nie mają wpływu, natomiast LCST polimerów pNIPA o małej masie cząsteczkowej ulega nieznacznej zmianie pod wpływem zmiany masy cząsteczkowej polimeru [21].

### 2.3.2. Wpływ soli

Wpływ soli, detergentów oraz rozpuszczalników organicznych na wytrącenie polimeru z roztworu wodnego podczas wzrostu temperatury badano już w latach sześćdziesiątych. Badania te dotyczyły głównie takich cząsteczek, jak glikol polietylenowy oraz poli(winylopirolidyna) [22-24]. W obecności soli w roztworze polimeru cząsteczki wody konkurują między sobą o dostępność w procesie solwatacji [25]. Wpływ obecności soli na przejście fazowe polimeru pNIPA, ale także innych polimerów, zależy od oddziaływań pomiędzy jonami tej soli a rozpuszczonym w niej polimerem oraz od oddziaływań soli z cząsteczkami rozpuszczalnika, tj. wody. Wraz ze wzrostem gęstości ładunku jonów zmiany temperatury punktu zmętnienia polimeru są coraz większe. Dlatego też nawet po niewielkim dodatku soli nieorganicznej (o dużej gęstości ładunku) do układu polimer/woda można spodziewać się zmiany CST.

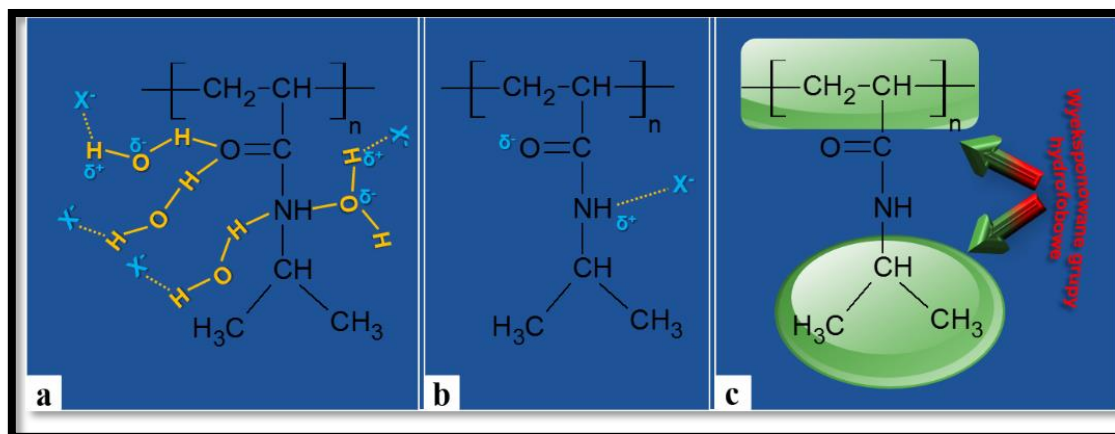
Jony soli mają znaczący wpływ na temperaturę LCST polimeru pNIPA i w związku z tym mają wpływ na uwalnianie leków z układów żelowych opartych na pNIPA [26,27]. W zastosowaniach układów czułych na temperaturę i opartych na polimerze pNIPA, takich jak: nośniki leków, sztuczne mięśnie lub części układów mikroanalitycznych, bardzo ważne jest dokładne zrozumienie oddziaływań polimer-elektrolit.



Wyniki eksperymentalne Eeckman'a i współpracowników dowiodły, że dodatek zwykłej soli do wodnego roztworu polimeru skutkuje zmniejszeniem temperatury punktu zmętnienia (efekt „wysalania”) ze wzrostem stężenia soli [26,27]. 1 M roztwór soli NaCl prowadzi do zmniejszenia temperatury LCST pNIPA o ok. 12°C (z około 32°C dla czystej wody do ok. 20°C dla wody zawierającej 1 M NaCl). Dodatkowo rodzaj soli i jej stężenie, a także wartościowość oraz rozmiary jonów soli mają istotny wpływ na LCST pNIPA. Znanych jest kilka wyjątków, dla których nie obserwuje się powyższego efektu wysalania; dotyczy to niektórych tјocyjanianowych lub czwartorzędowych soli amonowych [28,29]. Autorzy twierdzą, że zmniejszenie temperatury LCST polimeru pNIPA na skutek dodania elektrolitu wywołane jest zmianą struktury cząsteczek wody oraz zmianą orientacji cząsteczek wody, tworzących uwodnioną powłokę otaczającą polimer pNIPA.

Zhang i in. zbadali wpływ soli sodowych  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  oraz  $\text{SCN}^-$  na temperaturę LCST polimeru pNIPA i zauważyli, że temperatura LCST zależy od stężenia soli jak również od masy cząsteczkowej polimeru i jego stężenia [30]. Autorzy zmierzili temperaturę LCST polimeru pNIPA dla różnych stężeń soli. Dla każdego badanego stężenia soli obserwowano przesunięcie temperatury LCST polimeru w stronę niższych temperatur, tj. wartości temperatur mniejszych niż LCST czystego (bez dodatku soli) polimeru pNIPA, tj. ok. 32°C. Wielkość przesunięcia temperatury zależała od pozycji anionu soli w szeregu Hoffmeistera. Dla soli NaSCN w całym zakresie badanych stężeń, tj. od 0 do 1 M, temperatura LCST ulegała niewielkim zmianom, natomiast dla soli  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pierwszej w szeregu) obserwowano największe zmiany temperatury LCST. Autorzy zaproponowali trzy możliwe mechanizmy zmian temperatury LCST wywołane obecnością anionów soli (patrz rysunek 4). Zgodnie z pierwszym mechanizmem aniony soli otaczające polimer pNIPA polaryzują sąsiadujące z polimerem cząsteczki wody, a to z kolei ma wpływ na wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczkami wody i grupami amidowymi (patrz rysunek 4a). Zgodnie z drugim mechanizmem, wpływ anionów na temperaturę LCST może być związany z bezpośrednim wiązaniem się anionów z grupami amidowymi polimeru pNIPA (patrz rysunek 4b). Trzeci mechanizm zakłada, że aniony soli mogą mieć wpływ na hydratację hydrofobową polimeru pNIPA poprzez zwiększenie napięcia

powierzchniowego panującego we wnętrzu/wgłębieniu pomiędzy łańcuchami pNIPA i grupami izopropylowymi (patrz rysunek 4c).



**Rysunek 4.** Możliwe mechanizmy wpływu anionów soli na temperaturę LCST polimeru pNIPA.

### 2.3.3. Wpływ typu rozpuszczalnika

Rozpuszczalniki organiczne również mają wpływ na właściwości polimeru pNIPA. Wpływ ten jest równie ważny, co omawiany wcześniej wpływ wysalania. Pomiary punktu zmętnienia żeli pNIPA [31-33] oraz pomiary kalorymetryczne z udziałem cząsteczek liniowego pNIPA w roztworze [34] wykazały, że obecność rozpuszczalnika organicznego powoduje drastyczne zmiany temperatury CST. Polimer pNIPA rozpuszcza się w wielu rozpuszczalnikach organicznych pod warunkiem, że rozpuszczalniki te są zdolne do tworzenia wiązań wodorowych. Do rozpuszczalników tych należą: aceton, dimetyloformamid (DMF), dioksan, etanol, metanol oraz tetrahydrofuran (THF).

Rozpuszczalność polimeru pNIPA w dwuskładnikowych wodno-organicznych roztworach o niewielkim stężeniu rozpuszczalnika organicznego ulega zmniejszeniu, wykazując rzadkie zjawisko, zwane efektem „cononsolvency”. Efekt ten pierwszy raz zaobserwowano dla polimeru pNIPA w wodno-organicznych mieszaninach zawierających metanol, dioksan albo tetrahydrofuran jako rozpuszczalnik organiczny [35,36]. Dodanie dużej ilości rozpuszczalnika organicznego do wodnego roztworu polimeru pNIPA powoduje podwyższenie temperatury CST oraz zwiększenie zakresu temperatur rozpuszczalności polimeru. Dodatek małej ilości rozpuszczalnika, takiego

jak metanol, do roztworów pNIPA/woda początkowo zmniejsza temperaturę przejścia fazowego, natomiast dalsze dodawanie rozpuszczalnika powoduje wzrost temperatury CST polimeru.

## 2.4. Termodynamika przejścia fazowego pNIPA

Badania dotyczące zależności od temperatury oddziaływań pomiędzy polimerem pNIPA i wodą dostarczyły informacji na temat możliwych mechanizmów przejścia fazowego pNIPA oraz przemiany hydrofilowo-hydrofobowej. Ogólnie uważa się, że siłą napędową przejścia fazowego w temperaturze LCST w roztworze wodnym jest zmiana entropii układu [37-40]. Gdy temperatura jest niższa niż temperatura LCST, w entalpii swobodnej dominuje entalpia związana z obecnością wiązań wodorowych pomiędzy grupami amidowymi pNIPA i wodą. Wówczas polimer występuje w konformacji hydrofilowej kłęбка statystycznego. Natomiast, gdy temperatura jest wyższa niż LCST pNIPA, o znaku entalpii swobodnej decyduje człon entropowy solwatacji hydrofobowych grup izopropylowych oraz hydrofobowego szkieletu węglowego i polimer w roztworze wodnym występuje w postaci hydrofobowej, połączonych struktur globuli.

Heskins oraz Guilet jako pierwsi opisali termodynamikę przejścia fazowego polimeru pNIPA z dolną krytyczną temperaturą rozpuszczalności [41]. Energię swobodną Gibbsa tego układu opisuje poniższe równanie:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad 6$$

gdzie:  $\Delta G_m$  – zmiana entalpii swobodnej mieszania (tworzenia roztworu),  $\Delta H_m$  – zmiana entalpii mieszania,  $T$  – temperatura,  $\Delta S_m$  – zmiana entropii mieszania.

Istnieje wiele teoretycznych opisów zjawiska przejścia fazowego, większość z nich dotyczy układów na bazie polimeru pNIPA [42-44], a najpopularniejszym z nich jest półempiryczna teoria Floryego-Hugginsa [45].

## 2.5. Teoria Flory-Hugginsa

Zazwyczaj teorię Flory-Hugginsa stosuje się dla układów niejonowych. Dla układów niejonowych wkład entropii dany jest równaniem:

$$\Delta S_m = -k(n_1 \ln \varphi_1 + n_2 \ln \varphi_2) \quad 7$$

gdzie:  $k$  – stała Boltzmanna,  $n_i$  – liczba moli,  $\varphi_i$  – ułamek molowy lub objętościowy rozpuszczalnika ( $i = 1$ ) albo polimeru ( $i = 2$ ) dany przez:

$$\varphi_1 = \frac{x_1 n_1}{x_1 n_1 + x_2 n_2} \quad 8$$

$$\varphi_2 = \frac{x_2 n_2}{x_1 n_1 + x_2 n_2} \quad 9$$

gdzie:  $x_i$  – liczba cząstek ( $1 =$  rozpuszczalnik oraz  $2 =$  polimer). Dla rozpuszczalnika monomeru  $x_i = 1$ . Biorąc pod uwagę trzy rodzaje oddziaływań, rozpuszczalnik-rozpuszczalnik, polimer-polimer oraz rozpuszczalnik-polimer, energię oddziaływań można zapisać następującym równaniem:

$$\Delta H_m = kT \chi \varphi_2 n_1 x_1 \quad 10$$

gdzie:  $\chi \propto \frac{1}{T}$  to parametr Flory-Hugginsa'ego oddziaływania polimer-rozpuszczalnik. Parametr ten odpowiada za zmiany entalpii swobodnej, spowodowane procesem mieszania; zdefiniowany jest następującym równaniem:

$$\chi = -\frac{\Delta F}{kT} \quad 11$$

gdzie:  $\Delta F$  to zmiana energii swobodnej, związanej z tworzeniem się połączeń pomiędzy fragmentami łańcucha.

Wartość parametru  $\chi$  mieści się pomiędzy 0 a 1. Wzrost parametru  $\chi$  występuje dla słabszych rozpuszczalników polimeru, w których polimer rozpuszcza się w mniejszym stopniu,  $\chi$  nie jest stałą dla danego układu, lecz jest funkcją temperatury i stężenia. Jeśli

połączymy ze sobą czynnik entropowy mieszania oraz energię oddziaływań, to dla  $x_1 = 1$  entalpię swobodną mieszania można wyrazić jako:

$$\Delta G_m = kT(n_1 \ln \varphi_1 + n_2 \ln \varphi_2 + \chi \varphi_2 n_1) \quad 12$$

Potencjał chemiczny  $\mu_1$  rozpuszczalnika w roztworze względem jego potencjału chemicznego w czystej cieczy  $\mu_1^0$  można otrzymać, różniczkując entalpię swobodną mieszania, tj. równanie 12 względem liczby moli cząsteczek rozpuszczalnika –  $n_1$  [45]. Po pomnożeniu uzyskanego wyniku przez liczbę Avogadro  $N_A$ , otrzymamy:

$$\mu_1 - \mu_1^0 = RT[\ln(1 - \varphi_2) + (1 - \frac{1}{x_2})\varphi_2 + \chi \varphi_2^2] \quad 13$$

gdzie:  $R$  – stała gazowa

Dla większych wartości parametru  $x_2$  oraz większych stężeń, równanie 13 można zapisać jako:

$$\mu_1 - \mu_1^0 = RT[\ln(1 - \varphi_2) + \varphi_2 + \chi \varphi_2^2] \quad 14$$

Dla ciśnienia osmotycznego mamy następującą zależność:

$$\Pi V_1 = -(\mu_1 - \mu_1^0) \quad 15$$

gdzie:  $V_1$  to objętość molowa rozpuszczalnika.

Zatem po podstawieniu równania 14 do 15 ciśnienie osmotyczne można przedstawić jako:

$$\Pi = -(\frac{RT}{V_1})[\ln(1 - \varphi_2) + \varphi_2 + \chi \varphi_2^2] \quad 16$$



### 3. Żele

Żele to fizycznie lub chemicznie usieciowane homopolimery lub kopolimery, tworzące trójwymiarową sieć. Obecność czynnika sieciującego zapewnia żelom fizyczną integralność. Wodne żele (gdzie rozpuszczalnikiem jest woda) określa się jako hydrożele. Hydrożele posiadają dużą ilość zaabsorbowanej wody. Usieciowanie łańcuchów polimerowych powoduje, że polimery tracą swoją rozpuszczalność w wodzie. 1 g hydrożelu jest w stanie pochłoniąć nawet 1000 g wody [46,47]. Często pojęcia „żele” oraz „hydrożele” używa się zamiennie.

Można wyróżnić polimery usieciowane fizycznie, tzw. żele fizyczne lub odwracalne, oraz polimery usieciowane za pomocą wiązań kowalencyjnych, tzw. żele chemiczne lub trwałe [48,49]. Polimery usieciowane fizycznie to te, których tworzenie sieci polimerowej odbywa się na skutek sił elektrostatycznych oraz oddziaływań van-der Waals'a [50]. Hydrożele fizyczne cechują się niejednorodną budową, a niejednorodności są tworzone najczęściej przez fizycznie splątane łańcuchy polimerowe [49,51-53]. Polimery usieciowane chemicznie można otrzymać z monomerów lub z wcześniej zsyntezowanych polimerów poprzez połączenie ze sobą monomerów lub polimerów za pomocą trwałych wiązań kowalencyjnych [54-57].

Istnieje wiele możliwych wielkocząsteczkowych struktur hydrożeli fizycznych i chemicznych, na podstawie których można klasyfikować żele. Możliwe jest powstanie sieci polimerowej żeli w wyniku usieciowania bądź splątania homopolimerów liniowych, kopolimerów liniowych oraz kopolimerów blokowych lub szczepionych. Możliwe są także kompleksy polijon-jon wielowartościowy, polijon-polijon lub kompleksy wykorzystujące wiązania wodorowe. W końcu możliwe są sieci hydrofilowe, stabilizowane przez domeny hydrofobowe, oraz przenikające się sieci polimerowe – IPN [51].

Hydrożele można sklasyfikować na wiele innych sposobów. Biorąc pod uwagę naturę chemiczną bocznych grup funkcyjnych, można wyróżnić hydrożele obojętne oraz jonowe. Opierając się na morfologii, sieci hydrożelowe można podzielić na: amorficzne, półkryształiczne, struktury oparte na wiązaniach wodorowych, struktury

nadcząsteczkowe oraz agregaty hydrokoloidalne. Biorąc pod uwagę strukturę sieci polimerowej hydrożeli, można podzielić je na hydrożele makroporowate (duże pory od 0.1 do 1  $\mu\text{m}$ ), mikroporowate (100 – 1000 Å) i nanoporowate (10 – 100 Å) [58]. Natomiast biorąc pod uwagę zdolność niektórych hydrożeli do zmiany swoich rozmiarów pod wpływem określonego bodźca, można je podzielić na żele czułe na temperaturę, pH, światło, i in. [59-63]. Ze względu na rozmiar hydrożele można podzielić na: makrożele, mikrożele i nanożele. Najczęściej syntezowanymi żelami są żele oparte o polimery czułe na temperaturę.

Do monomerów, z których można otrzymać czułe na temperaturę hydrożele (makro- i mikro-), ulegające objętościowemu przejściu fazowemu w określonej temperaturze (zależnej od rodzaju monomeru), należą m.in.: *N*-etyloakryloamid [64], *N*-akryloilopirolidyna [65], *N*-etylometakryloamid [66] oraz monomery z grupy *N*-alkiloakryloamidów: *N*-izopropylakryloamid, *N*-izopropylometakryloamid [67] itp. Wprowadzając do takich żeli dodatkowe monomery, zawierające grupy karboksylowe, otrzymamy żele czułe na zmiany temperatury oraz pH.

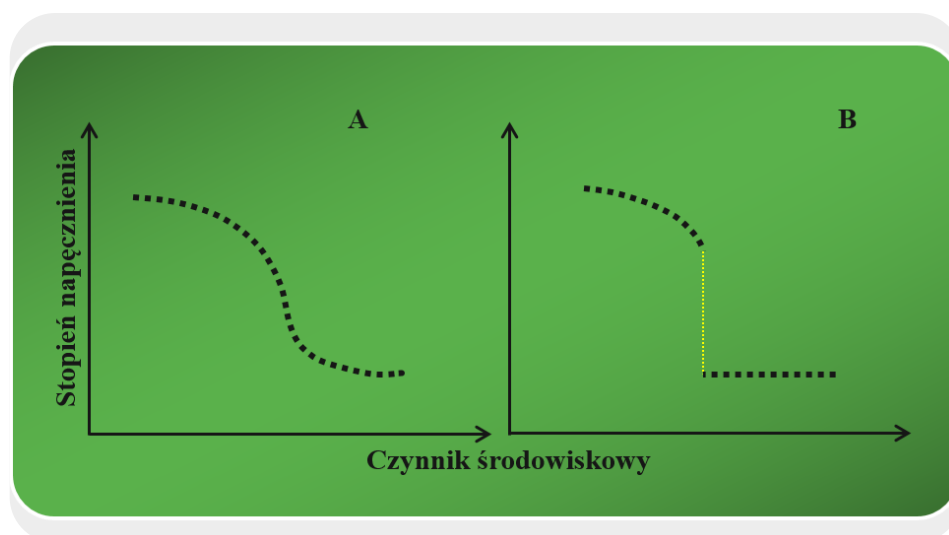
### 3.1. Przejście fazowe hydrożeli

Takie właściwości, jak pęcznienie oraz kurczenie się niektórych żeli na skutek niewielkich zmian warunków środowiskowych, czyni je materiałami „inteligentnymi”. Objętościowe przejście fazowe jest wynikiem oddziaływań pomiędzy łańcuchami polimerowymi a cząsteczkami rozpuszczalnika, i zazwyczaj jest ono procesem odwracalnym. Na skutek ustąpienia działania czynnika zewnętrznego skurczony żel może ponownie wchłonąć wyrzucony rozpuszczalnik i przejść w stan spęczniały.

Przejścia fazowe żeli mogą zachodzić albo w sposób ciągły albo nieciągły. Z ciągłym przejściem fazowym, określanym jako „syneraza”, mamy do czynienia wtedy, kiedy przejście fazowe pojawia się w pewnym zakresie wielkości czynnika środowiskowego (patrz rysunek 5A). Natomiast nieciągłe przejście fazowe występuje wtedy, kiedy dla konkretnej wielkości czynnika środowiskowego następuje gwałtowne kurczenie żelu. Wówczas na krzywej zależności stopnia napężnienia żelu od natężenia działającego czynnika środowiskowego, na skutek działania siły zewnętrznej, pojawia



się nieciągłość (rysunek 5B, kropkowana linia żółta) [68,69]. Przejścia fazowe żeli można traktować jako makroskopowy odpowiednik przejść wstęga/kłębek statystyczny-globula (coil-globule transition) [70,71].

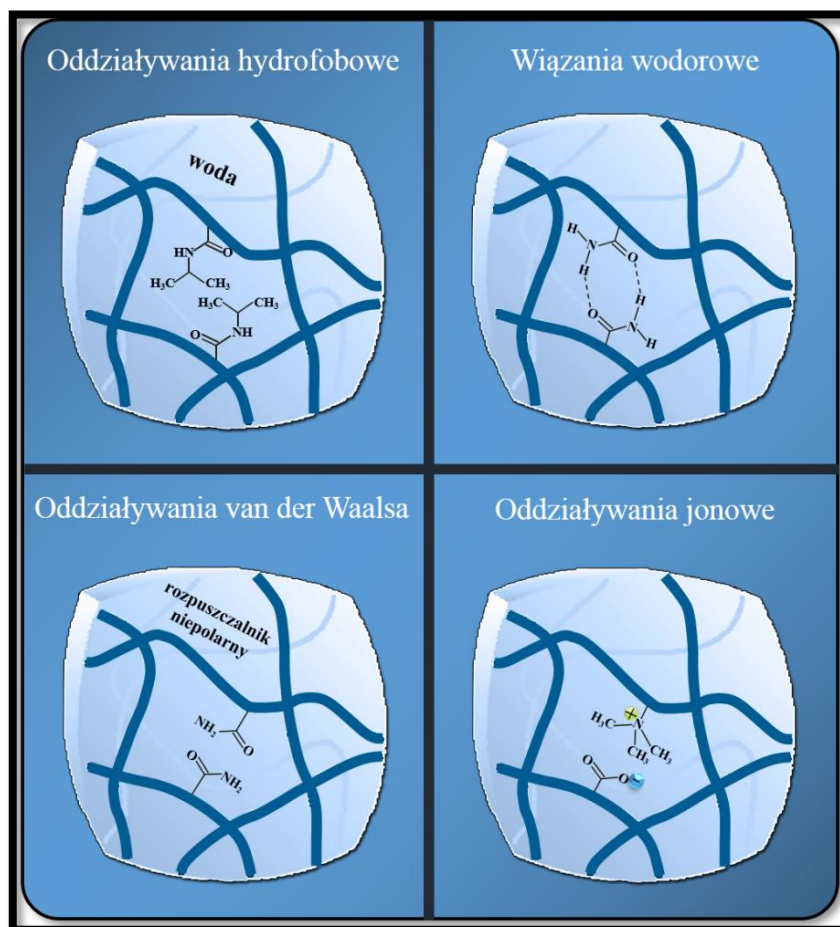


**Rysunek 5.** Zmiany stopnia napężnienia przy ciągłym (a) i nieciągłym (b) przejściu fazowym. Kropkowana linia żółta przedstawia nieciągłą zmianę rozmiarów.

Aby wytłumaczyć zjawisko przejścia fazowego hydrożeli, należy wziąć pod uwagę cztery rodzaje podstawowych oddziaływań: oddziaływania van der Waals'a, wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe oraz oddziaływania jonowe (patrz rysunek 6) [72]. Zazwyczaj żele ulegają przejściu fazowemu na skutek zachwiania równowagi w każdym ze wspomnianych oddziaływań.

Biorąc pod uwagę wpływ temperatury na pęcznienie/kurczenie żeli można wyróżnić trzy typy przejść fazowych:

- I. Pęcznienie żeli pod wpływem wzrostu temperatury [73].
- II. Kurczenie żeli pod wpływem wzrostu temperatury [73].
- III. Połączenie dwóch wspomnianych wyżej typów przejść fazowych, tzn. najpierw pęcznienie hydrożelu, następnie jego kurczenie wraz ze wzrostem temperatury; na wykresie zależności rozmiaru żelu od temperatury pojawia się maksimum [74].



**Rysunek 6.** Podstawowe typy oddziaływań pomiędzy grupami w sieci polimerowej.

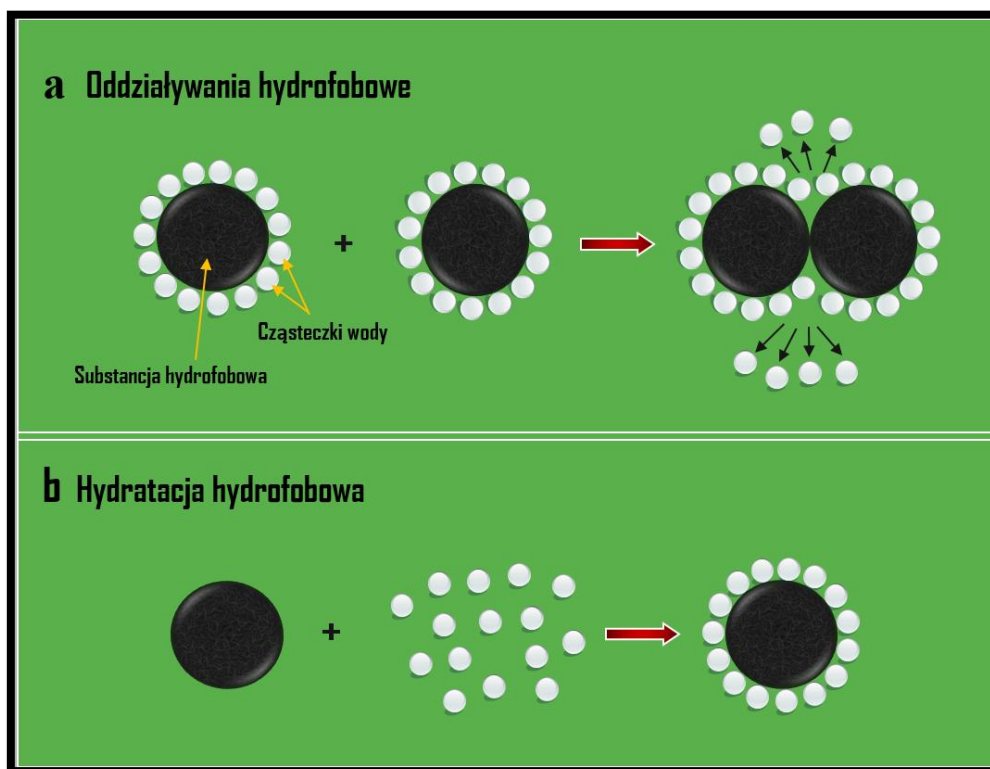
Hydrożelami z przejściami fazowymi należącymi do typu II są żele złożone z takich monomerów, jak: *N*-dietyloakryloamid, *N*-etyloakryloamid, *N*-izopropylakryloamid itp. Powyższe *N*-alkiloakryloamidy złożone są zarówno z grup hydrofobowych jak i hydrofilowych, przez co żele z nich zsyntezowane mogą ulegać odwracalnemu przejściu fazowemu w wodzie, kurcząc się wraz ze wzrostem temperatury. Temperatura objętościowego przejścia fazowego tych żeli zależy od hydrofobowości alkilowego podstawnika monomeru. W swojej pracy badawczej skupiłem się na hydrożelach opartych o *N*-izopropylakryloamid, ponieważ jedynie te żele ulegają przejściu fazowemu w temperaturze zbliżonej do temperatury ludzkiego ciała. Grupami hydrofilowymi w żelach pNIPA są grupy NH oraz C=O, natomiast grupami hydrofobowymi są grupy izopropylowe oraz łańcuch główny. Zmiany oddziaływań hydrofobowych oraz hydrofilowych – wywołane zmianą temperatury – odgrywają ważną rolę w przejściu fazowym żeli pNIPA.

## Hydratacja hydrofobowa/oddziaływania hydrofobowe

Gdy cząsteczki hydrofobowe spotkają się z cząsteczkami wody, można zaobserwować dwa procesy [75,76]:

- 1) **Hydratację hydrofobową** – cząsteczki wody tworzą dookoła cząstek hydrofobowych dobrze uporządkowaną strukturę, zwaną klatką.
- 2) **Oddziaływania hydrofobowe**. Cząstki hydrofobowe oddziałują ze sobą tworząc skupiska.

Ogólnie uważa się, że wzrost temperatury prowadzi do zmniejszenia całkowitej liczby cząsteczek wody zorganizowanych wokół cząstek hydrofobowych, co sprzyja oddziaływaniom hydrofobowym. W konsekwencji, wzrost temperatury faworyzuje oddziaływania hydrofobowe. Schematycznie procesy oddziaływań hydrofobowych oraz hydratacji hydrofobowej przedstawiłem na rysunku 7.



**Rysunek 7.** Schemat przedstawiający: (a) oddziaływania hydrofobowe, (b) hydratację hydrofobową.

## 3.2. Hydrożele pNIPA

Hydrożele pNIPA, nazywane często makrożelami pNIPA, czyli usieciowane polimery pNIPA, mają rozmiary zazwyczaj w skali milimetrowej i większej. Hydrożele pNIPA, syntezuje się przeprowadzając polimeryzację monomeru NIPA z czynnikiem sieciującym, najczęściej *N,N'*-metylenobisakryloamidem. Reakcję zapoczątkowuje się za pomocą inicjatora, najczęściej jakiegoś nadsiarczanu, i przeprowadza się ją w temperaturze pokojowej. W makrożelach pNIPA temperatura LCST polimeru przejawia się jako VPTT – temperatura objętościowego przejścia fazowego (Volume Phase Transition Temperature). Poniżej VPTT woda jest dobrym rozpuszczalnikiem i makrożele pNIPA występują w hydrofilowym stanie spęczniałym, bogatym w rozpuszczalnik. Powyżej VPTT woda zamienia się w zły rozpuszczalnik, następuje zwiększenie oddziaływań hydrofobowych i prowadzi to do zapadania się sieci polimerowej; żel kurczy się, przechodząc ze stanu spęczniałego hydrofilowego w odwodniony stan skurczony (relatywnie hydrofobowy). Przejście hydrożelu pNIPA ze stanu spęczniałego w stan skurczony charakteryzuje się zmianą barwy żelu z przeźroczystego na nieprzeźroczysty (biały), z jednoczesnym wydaleniem wody z hydrożelu. Spadek transmitancji (wzrost zmętnienia hydrożelu) oznacza tworzenie niejednorodności w strukturze hydrożelu, na jego powierzchni powstaje gęsta, cienka i skurczona warstewka [77-79]. Obecność czynnika sieciującego sprawia, że – w odróżnieniu od polimeru – hydrożele nie są całkowicie rozpuszczalne w wodzie, lecz pęcznią w niej i w konsekwencji są bogate w rozpuszczalnik. Makrożele pNIPA reagują na zmianę temperatury zmieniając swoje rozmiary, kurcząc się lub pęczniejąc w odwracalny sposób w temperaturze zbliżonej do LCST polimeru pNIPA, czyli w ok. 32°C. Temperatura VPTT żelu jest nieco inna niż temperatura LCST polimeru. Spowodowane jest to obecnością czynnika sieciującego. Ponadto VPTT zależy od wielu czynników: równowagi hydrofobowo-hydrofilowej, rodzaju rozpuszczalnika oraz gęstości usieciowania. VPTT hydrożeli oraz wrażliwość na bodźce inne niż temperatura, takie jak potencjał elektrody, pole magnetyczne, pH, siła jonowa, obecność niektórych jonów i in., można w łatwy sposób zmieniać, wprowadzając do sieci polimerowej – podczas syntezy żeli – monomery (komonomery) z odpowiednimi grupami funkcyjnymi.

Inną ważną właściwością hydrożeli, poza zdolnością do pęcznienia w odpowiedzi na bodźce środowiskowe, jest ich zdolność do magazynowania różnych związków chemicznych. Właściwość ta zależy od natury chemicznej, składu polimerowego żeli, jak również od struktury oraz morfologii sieci polimerowej.

### 3.3. Pęcznienie hydrożeli pNIPA

Trzy główne czynniki wpływają na pęcznienie hydrożeli [58]: stopień usieciowania, struktura chemiczna i bodźce środowiskowe.

Stopień usieciowania definiuje się jako stosunek liczby moli czynnika sieciującego do liczby moli powtarzających się jednostek monomerycznych. Stopień usieciowania jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na pęcznienie hydrożeli. Im więcej czynnika sieciującego znajduje się w sieci polimerowej hydrożelu, tym większy jest jego stopień usieciowania i bardziej zwarta jest jego struktura. Ponadto silne usieciowanie hydrożelu ogranicza swobodę łańcuchów polimerowych, zatem zmniejsza stopień napęcznienia żelu [80-82].

Hydrożele zawierające więcej grup hydrofilowych pęcznią w większym stopniu. Hydrożele posiadające dodatkowe grupy hydrofobowe nie będą pęcznieć w dużym stopniu w obecności wody.

Pęcznienie hydrożeli środowiskowo-czułych zależy od specyficznych bodźców, takich jak stężenie jonów, temperatura, pH, skład rozpuszczalnika, i in.. Na przykład pęcznienie hydrożeli termo-czułych może być wywołane przez zmiany temperatury środowiska, w którym się one znajdują.

Oddziaływania hydrofobowe odgrywają istotną rolę w przejściu fazowym hydrożeli pNIPA w wodzie oraz innych hydrożeli na bazie *N*-alkiloakryloamidów. Dlatego zmiany hydrofobowości sieci polimerowej żelu lub zmiany właściwości rozpuszczalnika, w którym znajdują się hydrożele, mają wpływ na przejście fazowe żeli. W żelach opartych na *N*-alkiloakryloamidach hydrofobowe są grupy *N*-alkilowe. Ich obecność znacząco wpływa na temperaturę przejścia fazowego, podczas gdy

elastyczność oraz właściwości fizyczne sieci polimerowej głównie mają wpływ na stopień napężnienia żeli.

Z termodynamicznego punktu widzenia przejście fazowe żeli można przedstawić za pomocą kombinacji entalpii swobodnej elastyczności sieci, entalpii swobodnej mieszania sieci polimerowej z rozpuszczalnikiem oraz entalpii swobodnej, związanej z pojawieniem się zjonizowanych grup w sieci polimerowej żelu w przypadku wprowadzenia do niej dodatkowych zjonizowanych grup funkcyjnych. Ponieważ żele oparte o pNIPA oraz o inne *N*-alkilokryloamidy są niejonowe, ich pęcznienie zależy jedynie od dwóch pierwszych czynników [45,83].

Zgodnie z teorią Flory-Hugginsa, całkowitą entalpię swobodną żelu ( $\Delta G$ ) można przedstawić jako sumę dwóch składników:

$$\Delta G = \Delta G_{el} + \Delta G_{mix} \quad 17$$

gdzie:  $\Delta G_{el}$  jest entalpią swobodną elastyczności sieci, a  $\Delta G_{mix}$  jest entalpią swobodną mieszania sieci z rozpuszczalnikiem.  $\Delta G_{mix}$  ma dwie składowe: składową entropową oraz składową entalpową.

Zdolność jednorodnego mieszania się jest zazwyczaj wyrażana przez parametr  $\chi$ , opisujący oddziaływania polimer-rozpuszczalnik. Kiedy w sieci polimerowej znajdują się grupy funkcyjne zdolne do jonizacji, można wyróżnić dodatkowy, trzeci składnik ( $\Delta G_{ch}$ ), związany z oddziaływaniami Columbowskimi pomiędzy naładowanymi fragmentami sieci a przeciwnonami.

Po przekształceniu równania na entalpię swobodną mieszania (patrz równanie 12) oraz przyjmując, że liczba cząsteczek polimeru ( $n_2$ ) jest równa jeden, ze względu na brak pojedynczych cząsteczek polimeru w strukturze sieci polimerowej żelu, wyrażenie na  $\Delta G_{mix}$  ma postać:

$$\Delta G_{mix} = kT(n_1 \ln \varphi_1 + \chi \varphi_2 n_1) \quad 18$$

Natomiast  $\Delta G_{el}$  ma postać:

$$\Delta G_{el} = \left(\frac{kT\nu_e}{2}\right)(3\alpha_s^2 - 3 - \ln\alpha_s^3) \quad 19$$

gdzie:  $\nu_e$  jest całkowitą liczbą łańcuchów w sieci polimerowej żelu (wielkość ta może być oszacowana na podstawie ilości użytego czynnika sieciującego w trakcie syntezy),  $\alpha_s = \alpha_x = \alpha_y = \alpha_z$  są parametrami związanymi ze zmianą rozmiarów sieci, czyli stopniem napężnienia żeli oraz:

$$\alpha_s^3 = \frac{V}{V_0} = \frac{1}{\phi_2} = \frac{V_0 + \frac{n_1 V_1}{N_A}}{V_0} \quad 20$$

gdzie:  $V$  – objętość napężnionego żelu,  $V_0$  – objętość żelu maksymalnie skurczonego,  $V_1$  – objętość molowa rozpuszczalnika a  $N_A$  – liczba Avogadro. Zatem równanie na  $\Delta G_{el}$  wygląda następująco:

$$\Delta G_{el} = \left(\frac{kT\nu_e}{2}\right) \left[ 3 \left( \frac{1}{\phi_2} \right)^{\frac{2}{3}} - 3 - \ln \left( \frac{1}{\phi_2} \right) \right] \quad 21$$

Natomiast równanie na całkowitą entalpię swobodną ( $\Delta G$ ) ostatecznie ma następującą postać:

$$\Delta G = kT[(n_1 \ln \phi_1 + \chi \phi_2 n_1) + \left(\frac{\nu_e}{2}\right) \left[ 3 \left( \frac{1}{\phi_2} \right)^{\frac{2}{3}} - 3 - \ln \left( \frac{1}{\phi_2} \right) \right]] \quad 22$$

Różnicę potencjału chemicznego można przedstawić jako:

$$\mu_1 - \mu_1^0 = \Delta \mu_{el} - \Delta \mu_{mix} \quad 23$$

gdzie:  $\Delta \mu$  dotyczy potencjału chemicznego rozpuszczalnika przenikającego do żelu,  $\mu_1$  jest potencjałem chemicznym rozpuszczalnika w sieci polimerowej żelu oraz  $\mu_1^0$  jest potencjałem chemicznym czystego rozpuszczalnika i można go obliczyć różniczkując

równanie na całkowitą entalpię swobodną ( $\Delta G$ ) względem liczby cząsteczek rozpuszczalnika ( $n_1$ ) przy zachowaniu stałej temperatury i ciśnienia.

Po zróżniczkowaniu równanie na  $\Delta G$  ma postać:

$$\mu_1 - \mu_1^0 = RT[\ln(1 - \varphi_2) + \varphi_2 + \chi\varphi_2^2 + V_1 \left(\frac{v_e}{V_0}\right) \left(\varphi_2^{\frac{1}{3}} - \frac{\varphi_2}{2}\right)] \quad 24$$

Dla żelu, znajdującego się w stanie równowagi, różnica pomiędzy potencjałem chemicznym rozpuszczalnika na zewnątrz żelu a jego potencjałem chemicznym wewnątrz żelu musi równać się zero. Dlatego też zmiany potencjału chemicznego, powstałe na skutek mieszania żelu z rozpuszczalnikiem oraz działania sił elastyczności, muszą się wzajemnie równoważyć. Dla żelu znajdującego się w stanie równowagi ciśnienie osmotyczne wynosi zero. Zmiany składu sieci polimerowej żeli, spowodowane wprowadzaniem do sieci dodatkowych komonomerów, lub zmiany składu rozpuszczalnika, w którym znajdują się żele – prowadzą do zmian ciśnienia osmotycznego w żelach, wywołanych oddziaływaniami pomiędzy łańcuchami polimerowymi a rozpuszczalnikiem (człon mieszania w teorii Flory-Hugginsa). Ciśnienie osmotyczne ma wpływ na pęcznienie żelu jedynie wtedy, gdy znajduje się on w obszarze przejścia fazowego. Ciśnienie osmotyczne  $\Pi$  hydrożelu podczas procesu pęcznienia jest sumą ciśnienia powstałego w wyniku mieszania sieci polimerowej z rozpuszczalnikiem ( $\Pi_{mix}$ ) oraz w wyniku odkształceń sieci polimerowej żelu ( $\Pi_{el}$ ). Ponadto dla żeli, które zawierają w sieci polimerowej zjonizowane grupy funkcyjne, można dodatkowo wyróżnić ciśnienie osmotyczne, powstałe na skutek różnicy stężeń jonów pomiędzy roztworem a zjonizowaną siecią polimerową żelu ( $\Pi_{jon}$ ), oraz ciśnienie powstałe na skutek oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy ładunkami w łańcuchach polimerowych ( $\Pi_{elst}$ ). Dla niejonowych żeli udział  $\Pi_{jon}$  oraz  $\Pi_{elst}$  można pominąć i wówczas całkowite ciśnienie osmotyczne  $\Pi$  można wyrazić równaniem w podobny sposób, jak entalpię swobodną:

$$\Pi = \Pi_{mix} + \Pi_{el} \quad 25$$

Zgodnie z teorią Flory-Huggins'a,  $\Pi_{mix}$  dane jest przez:



$$\Pi_{mix} = -\left(\frac{RT}{V_1}\right)[\ln(1 - \varphi_2) + \varphi_2 + \chi\varphi_2^2] \quad 26$$

Natomiast  $\Pi_{el}$  dane jest przez:

$$\Pi_{el} = -RT\rho(\varphi_2^{\frac{1}{3}} - 0.5\varphi_2) \quad 27$$

gdzie:  $\rho$  jest gęstością usieciowania.

Dla żelu znajdującego się w stanie równowagi ciśnienie osmotyczne wynosi zero i równanie na całkowite ciśnienie osmotyczne  $\Pi$  można wyrazić jako:

$$-\left(\frac{1}{V_1}\right)\left[\ln(1 - \varphi_2) + \varphi_2 + \chi\varphi_2^2 + \rho\left(\varphi_2^{\frac{1}{3}} - 0.5\varphi_2\right)\right] = 0 \quad 28$$

### 3.4. Mechanizm pęcznienia hydrożeli oraz jego szybkość

Podczas procesu pęcznienia woda przenika do sieci polimerowej żelu i można wyróżnić trzy etapy, kolejno [84]:

- Etap 1: dyfuzja cząsteczek wody do sieci polimerowej.
- Etap 2: rozluźnienie/relaksacja łańcuchów polimerowych spowodowana procesem hydratacji.
- Etap 3: pęcznienie sieci polimerowej w wodzie pod wpływem relaksacji.

Szybkość procesu pęcznienia żelu jest różna i zależy od szybkości najwolniejszego etapu. Procesowi pęcznienia/kurczenia hydrożeli towarzyszy zmiana właściwości fizycznych oraz barwy żeli. Hydrożele oparte o pNIPA oraz inne hydrożele są przezroczyste lub prawie przezroczyste (zależnie od polimeru na bazie którego są wykonane) w stanie spęczniałym. Podczas wzrostu temperatury, hydrożel pNIPA przechodzi ze stanu spęczniałego w stan skurczony (w temperaturach powyżej temperatury VPTT). Wraz ze wzrostem temperatury hydrożele stają się coraz bardziej

mętne (białe) i wzrasta współczynnik załamania światła (patrz rysunek 11), ponieważ tworzą się niejednorodności w strukturze sieci polimerowej żeli. Zjawisku temu towarzyszy spadek transmitancji [77]. Żele kurczą się dużo szybciej w wyższych temperaturach. Oznacza to, że siły odpowiadające za kurczenie się żeli rosną wraz ze wzrostem temperatury, natomiast zgromadzone wewnątrz żeli duże ciśnienie hydrostatyczne prowadzi do szybkiego wydalenia z żelu wody. Podczas wzrostu temperatury zewnętrzna powierzchnia żelu jest w kontakcie z cieplejszą wodą i kurczy się natychmiast, tworząc gęstsza niż wewnątrz żelu warstwę powierzchniową. Do czasu pojawienia się tej cienkiej, gęstej i skurczonej warstwy powierzchniowej żelu, proces kurczenia się sieci polimerowej odbywa się zgodnie z „dyfuzją kolektywną”. Utworzona na powierzchni żeli cienka, bogata w polimer warstwa jest wystarczająco gęsta, aby utrudnić wypływ wody z wnętrza żelu; powstaje granica faz pomiędzy obszarem żelu całkowicie spęczniałym a skurczonym obszarem żelu, uniemożliwiając przez pewien okres czasu kurczenie się żelu. Podczas całego procesu kurczenia, najpierw następuje szybkie kurczenie się żelu, następnie, z powodu tworzenia się gęstej warstwy powierzchniowej, żel kurczy się powoli [85]. Tworzenie się tej niejednorodnej warstwy na powierzchni żeli, czułych na temperaturę, spowodowane jest wysoką termoczułością żeli pNIPA. Zjawisko to ma duży wpływ na zmniejszenie szybkości przejścia fazowego. W takim przypadku, o szybkości pęcznienia żelu decyduje proces relaksacji (etap 2). Powyżej temperatury przejścia fazowego żel występuje w stanie skurczonym, w którym dominują oddziaływania łańcuch-łańcuch. Ilość wody, jaką wysuszony żel jest w stanie zaabsorbować, jest dla krótkich czasów proporcjonalna do pierwiastka kwadratowego z czasu oddziaływania rozpuszczalnika z żelem. Woda jest absorbowana przez żel na drodze dyfuzji. Proces relaksacji sieci polimerowej ma również wpływ na proces pęcznienia. Według Tanaka oraz Sato [86] ruch sieci polimerowej spowodowany procesem pęcznienia odbywa się zgodnie z równaniem dyfuzji. Kinetykę procesu pęcznienia czułego na temperaturę hydrożelu pNIPA, ale także innych czułych na temperaturę hydrożeli, można opisać poniższym równaniem[86-88]:

$$\Delta R(t) = \frac{6\Delta R_0}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D_c}{R^2} t\right) \cong \frac{6\Delta R_0}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 D_c}{R^2} t\right) \quad 29$$

gdzie:  $D_c$  jest współczynnikiem dyfuzji sieci polimerowej w danym ośrodku,  $R$  jest promieniem sferycznego żelu po osiągnięciu równowagowego stopnia napęcznienia,

$\Delta R(t)$  to zmiany promienia w czasie  $t$ ,  $\Delta R_0$  jest całkowitą zmianą promienia. Promień żelu podczas procesu pęcznienia rośnie wykładniczo.

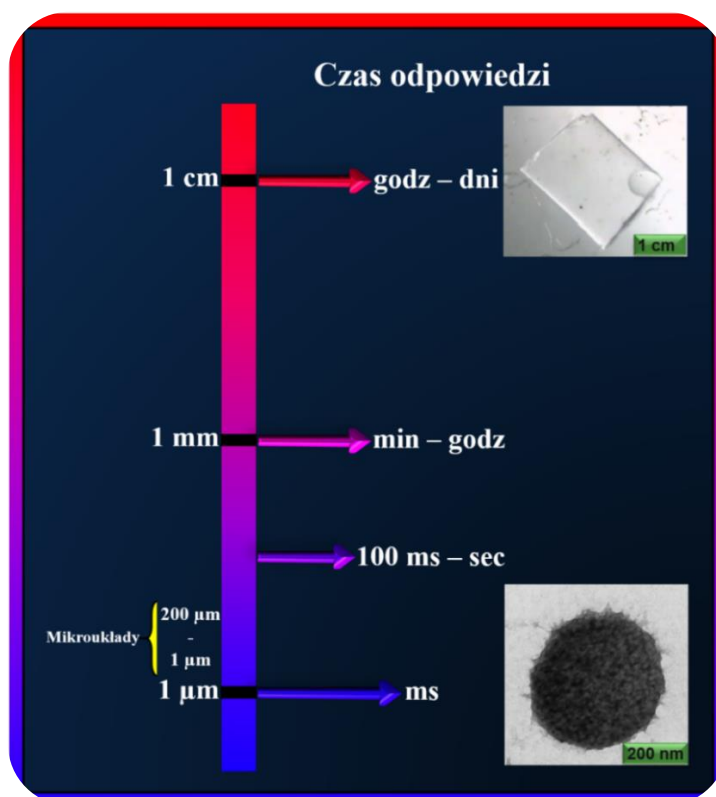
Tanaka [89] wykazał, że szybkość procesu pęcznienia oraz kurczenia się żeli i tym samym szybkość odpowiedzi na czynniki zewnętrzne silnie zależy od rozmiaru żelu oraz wspólnego współczynnika dyfuzji hydrożelu, który z kolei zależy od składu sieci polimerowej (monomery budujące sieć polimerową) oraz jej budowy. Współczynnik dyfuzji zależy też od kształtu żelu. W przypadku równości średnicy kuli ze średnicą walca i grubością dysku współczynnik dyfuzji dla walca i dysku jest odpowiednio 1.5 i 3 razy mniejszy niż dla żelu sferycznego. Charakterystyczny czas pęcznienia/kurczenia się hydrożelu, tzw. czas relaksacji sieci, ( $\tau$ ) jest wprost proporcjonalny do kwadratu promienia –  $R$  oraz odwrotnie proporcjonalny do współczynnika dyfuzji sieci polimerowej w danym ośrodku –  $D_c$  [90]:

$$\tau = \frac{R^2}{\pi^2 D_c} \quad 30$$

gdzie:  $D_c$  – współczynnik dyfuzji sieci polimerowej w danym ośrodku, zwany wspólnym współczynnikiem dyfuzji żelu. Jest on parametrem związanym z elastycznymi właściwościami sieci oraz tarcieniem pomiędzy siecią polimerową a rozpuszczalnikiem w hydrożelu.

Czas relaksacji dla cylindrycznego i dyskowego żelu jest w przybliżeniu 2.0 i 5.7 razy większy od czasu relaksacji dla żelu kulistego [88]. Im większy wspólny współczynnik dyfuzji i mniejszy rozmiar hydrożelu, tym szybciej zachodzi przejście fazowe. W rezultacie, całkowite skurczenie hydrożeli o rozmiarach w skali milimetrowej (lub większej) trwa godziny lub nawet dni. Szybkość kurczenia się hydrożelu ma istotne znaczenie z punktu widzenia możliwych zastosowań. Takie znaczenie pojawia się w zastosowaniu usieciowanych makrożeli na bazie pNIPA jako nośników leków w systemach dostarczania leków. Niestety, ze względu na duże rozmiary żelu i w związku z tym – szybką reakcję powierzchni żelu na temperaturę oraz powolną reakcję wnętrza żelu na temperaturę – podczas kurczenia się dużych żeli, gdy temperatura wzrośnie powyżej temperatury VPTT, na powierzchni usieciowanego

hydrożelu szybko tworzy się skurczona i gęsta warstewka. Wówczas woda z rozpuszczonym w niej lekiem ma trudności w wydostaniu się z wnętrza żelu [91]. Jej wydostanie nastąpi dopiero po całkowitym skurczeniu się żelu. Jednym ze sposobów na zwiększenie szybkości procesu przejścia fazowego jest zwiększenie współczynnika dyfuzji poprzez zmianę składu lub architektury sieci polimerowej hydrożeli. Yoshida i in. przyczepili do tradycyjnych usieciowanych hydrożeli pNIPA liniowe łańcuchy polimeru pNIPA [92] w taki sposób, aby przeciwległe końce łańcuchów były wolne. Gdy zwiększono temperaturę powyżej temperatury LCST, skurczeniu najpierw uległy liniowe łańcuchy pNIPA. Skurczone łańcuchy pNIPA uległy dehydratacji, prowadząc do powstania hydrofobowych zarodków, które znacznie przyspieszyły kurczenie usieciowanych hydrożeli. Najprostszym sposobem na zwiększenie szybkości procesu przejścia fazowego hydrożeli jest synteza żeli o mniejszych rozmiarach: w skali mikrometrów. Takie żele otrzymały nazwę mikrożeli. Na rysunku 8 przedstawiłem czas odpowiedzi żeli w zależności od ich rozmiarów. W żelach o rozmiarach od 1 mm do 1 cm czas, jaki potrzebny jest do ich całkowitego skurczenia, to minuty a nawet dni.



**Rysunek 8.** Korelacja między czasem reakcji żelu na bodziec a jego rozmiarem.

W mikrożelach przejście fazowe zachodzi w czasie od kilkuset milisekund do kilku sekund. Współczynniki dyfuzji dla typowych sieci polimerowych są rzędu  $10^{-7} - 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  oraz zależą od stężenia polimeru i gęstości usieciowania [93]. Zatem dla żeli o mikrometrowych rozmiarach czas  $\tau$  powinien być rzędu 0.001 – 0.01 s.



## 4. Mikrozele

W literaturze używa się dwóch terminów opisujących skalę rozmiarów hydrożeli: makrozele oraz mikro- lub nanozele. W nanotechnologii przedrostek „nano” stosuje się zwykle dla obiektów o rozmiarach w skali pomiędzy 1 – 100 nm [94]. Natomiast w nanomedycynie przedrostek „nano” może opisywać struktury o rozmiarach submikronowych.

Ogólną definicję mikrożeli podał Saunders [17]. Zdefiniował on „cząstki mikrożelu” jako usieciowane cząstki pęczniejące w rozpuszczalniku. Inni autorzy definiują mikrozele, jako układ składający się z dwóch faz: a) fazy rozproszonej, którą stanowią cząstki żelu (usieciowane cząstki polimeru) o rozmiarach od 1 nm do 1  $\mu$ m, równomiernie rozproszone w rozpuszczalniku i pęczniejące w nim, oraz b) fazy rozpraszającej, czyli fazy ciągłej, którą stanowi rozpuszczalnik [95]. Rozmiary mikrożeli są porównywalne z rozmiarami polimerów liniowych o dużej masie cząsteczkowej (w przybliżeniu  $10^6$  Da). Struktura wewnętrzna mikrożeli jest podobna do struktury sieci [95]. Oprócz terminu „mikrożel” w literaturze można spotkać wiele innych nazw (określających układy małych usieciowanych cząstek), takich jak: „mikrocząstki polimerowe” [96], „mikrosfery hydrożelowe” [97], „cząstki lateksowe” [98] i „ultradrobne mikrosfery” [99]. Mikrozele wykazują właściwości podobne do polimerów oraz pęczniejących w wodzie makroskopowych żeli, jednak, jak wspomniałem wcześniej, są to cząstki niepołączone ze sobą, które ze względu na małe rozmiary reagują bardzo szybko na bodziec zewnętrzny. Podobnie jak wodne żele, wodne koloidalne mikrozele (gdzie rozpuszczalnikiem jest woda) również określa się jako hydrozele. Mikrozele zaliczane są do miękkiej materii. Podobnie do makrożeli, mikrozele w stanie spęczniałym zawierają do 99% objętości wody, a skurczone mikrozele zawierają objętościowo ok. 20% (lub mniej) wody. Właściwości mikrożeli zależą od metody ich syntezy, gęstości usieciowania, stężenia, rodzaju i rozpuszczalności użytych podczas syntezy monomerów oraz składu użytego rozpuszczalnika. Zależnie od składu monomerowego, mikrozele mogą pęcznieć w wodnych albo niewodnych rozpuszczalnikach. Sieć polimerowa cząstek mikrożeli z powodu porowatej struktury, podobnej do gąbki, powoduje, że mikrozele pęcznieją

w odpowiednim rozpuszczalniku [17,64]. Stopień spęczenia mikrożeli zależy od stopnia usieciowania.

Mikrozele podobnie jak makrozele mogą wykazywać wrażliwość na zmiany różnych czynników środowiskowych, takich jak siła jonowa [100,101], temperatura [100-103], pH [99,100,104], stężenie różnych jonów [98,104], potencjał redoks [100,105-107], pole elektryczne [108]. Wrażliwość ta polega na zmianie rozmiarów i tym samym zmianie stopnia napęczenia mikrożeli. Mikrozele, bazujące na termoczułych polimerach, także posiadają wrażliwość na temperaturę i wykazują przejście fazowe zależne od temperatury [109].

Ze względu na usieciowanie, mikrozele są nierozpuszczalne w wodzie i nie tworzą roztworów, w przeciwieństwie do liniowych oraz rozgałęzionych polimerów. Mikrozele można traktować więc jako zawiesiny koloidalne.

## **4.1. Klasyfikacja mikrożeli**

Mikrozele można sklasyfikować na dwa sposoby. Pierwszy sposób dotyczy natury fizycznej oraz chemicznej czynnika sieciującego, odpowiadającego za strukturę sieci oraz skończony rozmiar mikrożeli. W związku z powyższym mikrozele, podobnie jak makrozele, można podzielić na mikrozele usieciowane fizycznie i mikrozele usieciowane chemicznie. Drugi sposób klasyfikacji opiera się na wrażliwości mikrożeli na specyficzny bodziec.

### **4.1.1. Klasyfikacja ze względu na rodzaj usieciowania**

#### **Mikrozele usieciowane fizycznie**

W przypadku fizycznie usieciowanych mikrożeli, tworzenie sieci polimerowej odbywa się za pomocą niekowalencyjnych oddziaływań, takich jak oddziaływania hydrofobowe [110-113] oraz oddziaływania jonowe [114,115]. Mikrozele usieciowane fizycznie to idealne układy biodegradowalne, ponieważ mogą w odwracalny sposób przechodzić z formy rozpuszczonej w formę żelu. Mikrozele usieciowane fizycznie



używane są do kapsułkowania leków, komórek oraz białek, które następnie mogą zostać uwolnione na skutek rozpuszczenia sieci polimerowej. Fizycznie usieciowane mikrozele są również wrażliwe na zmiany różnych czynników zewnętrznych; w odpowiednich warunkach mogą stracić swoją stabilność i ulec rozpadowi na pojedyncze łańcuchy polimerowe. Na przykład jonowo usieciowane mikrozele mogą rozpadać się pod wpływem zmian stężenia soli w środowisku. Fizycznie usieciowane mikrozele często zbudowane są z biopolimerów. Na przykład mikrozele oparte o chitozan lub jego pochodne można otrzymać poprzez usieciowanie polimeru za pomocą wielofunkcyjnego związku nieorganicznego, takiego jak tripolifosforan [116,117], lub za pomocą przeciwnie naładowanego polimeru, takiego jak DNA. Innymi przykładami fizycznie usieciowanych biopolimerów są: dekstran, agaroz, alginian oraz karagenina [114,115,118,119].

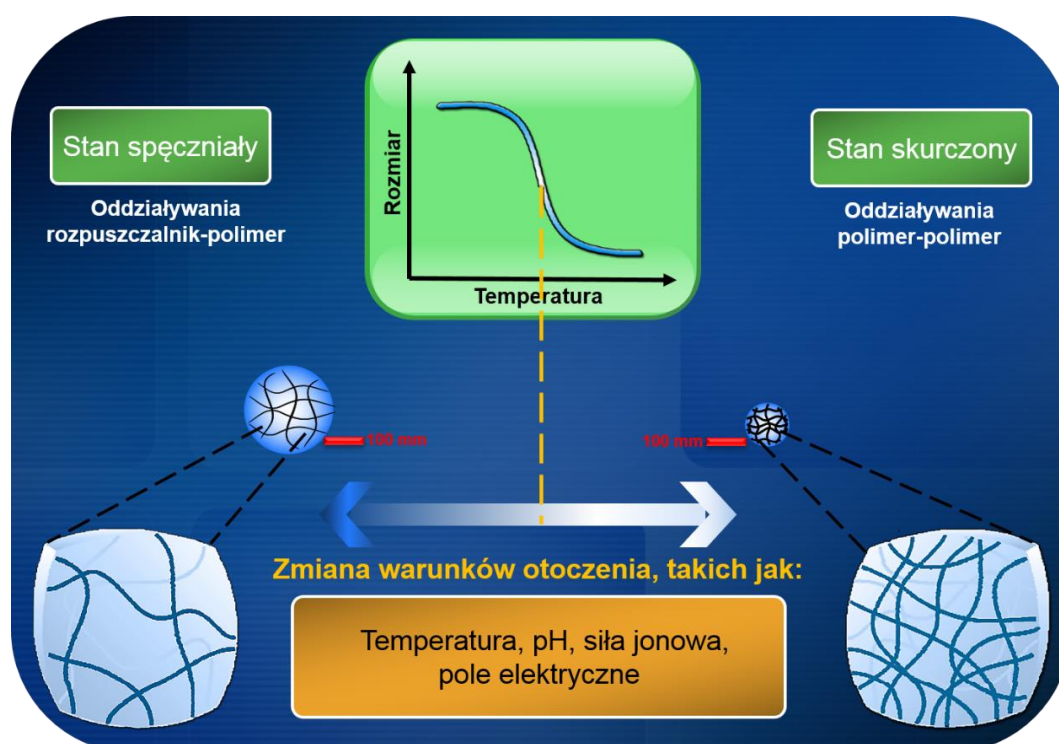
#### **Mikrozele usieciowane chemicznie**

Chemicznie usieciowane mikrozele, z powodu natury kowalencyjnej wiązań, są relatywnie bardziej stabilne niż mikrozele usieciowane fizycznie. Mikrozele usieciowane chemicznie mają trwałą strukturę. Niemniej jednak do ich sieci polimerowej można wprowadzać nietrwałe ugrupowania, na przykład podatne na redukcję mostki disiarczkowe. Kowalencyjnie usieciowane mikrozele zazwyczaj syntezuje się za pomocą polimeryzacji monomerów w obecności czynnika sieciującego. Przykładowo: poli(2-hydroksyetylo metakrylan) otrzymuje się poprzez polimeryzację 2-hydroksy metakrylanu z dimetakrylanem glikolu etylenowego jako czynnikiem sieciującym [120].

#### **4.1.2. Klasyfikacja mikrożeli ze względu na czułość na bodźce środowiskowe**

Mikrozele można również podzielić na mikrozele czułe na bodźce oraz nieczułe na bodźce. Mikrozele nieczułe na bodźce po prostu pęcznieją pod wpływem kontaktu z wodą, natomiast mikrozele czułe na bodźce, jako tzw. materiały inteligentne, pęcznieją lub kurczą się w odpowiedzi na niewielkie zmiany parametrów środowiska. Do zmian tych należą m.in.: zmiany temperatury, pH, pola elektrycznego,

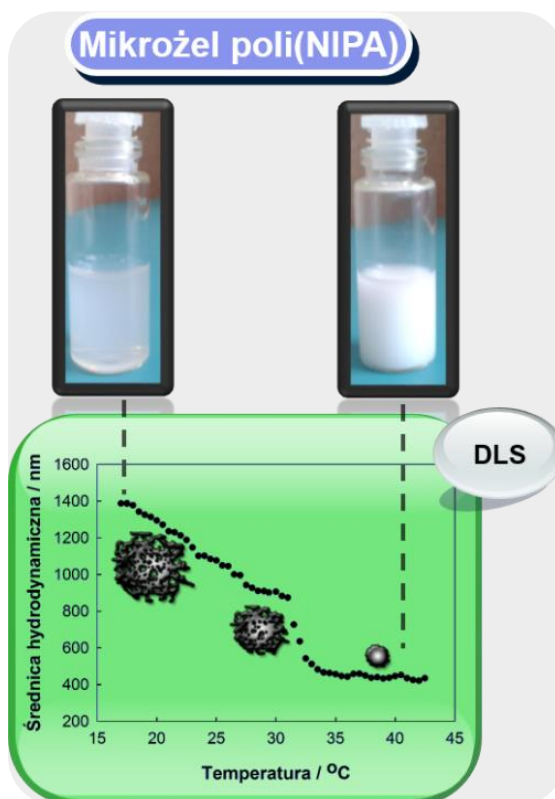
magnetycznego, potencjału redoks, i in. (patrz rysunek 9). Mikrożele mogą również reagować zmianą swoich rozmiarów w odpowiedzi na pojawienie się w ich otoczeniu odpowiednich biomolekuł/enzymów. Niektóre mikrożele mogą być wrażliwe jednocześnie na kilka wyżej wymienionych bodźców środowiskowych. Istnieją także mikrożele, które pod wpływem bodźca po prostu degradują się. Możliwe jest to wtedy, kiedy w sieci polimerowej obecne są odpowiednie wiązania podatne na degradację, na przykład mostki disiarczkowe. Redukcja mostków prowadzi do degradacji mikrożelu.



**Rysunek 9.** Schematyczne przedstawienie przejścia ze stanu spęczniałego do skurczonego w środowiskowo-czułych mikrożelach pod wpływem bodźców środowiskowych.

## 4.2. Mikrożele pNIPA

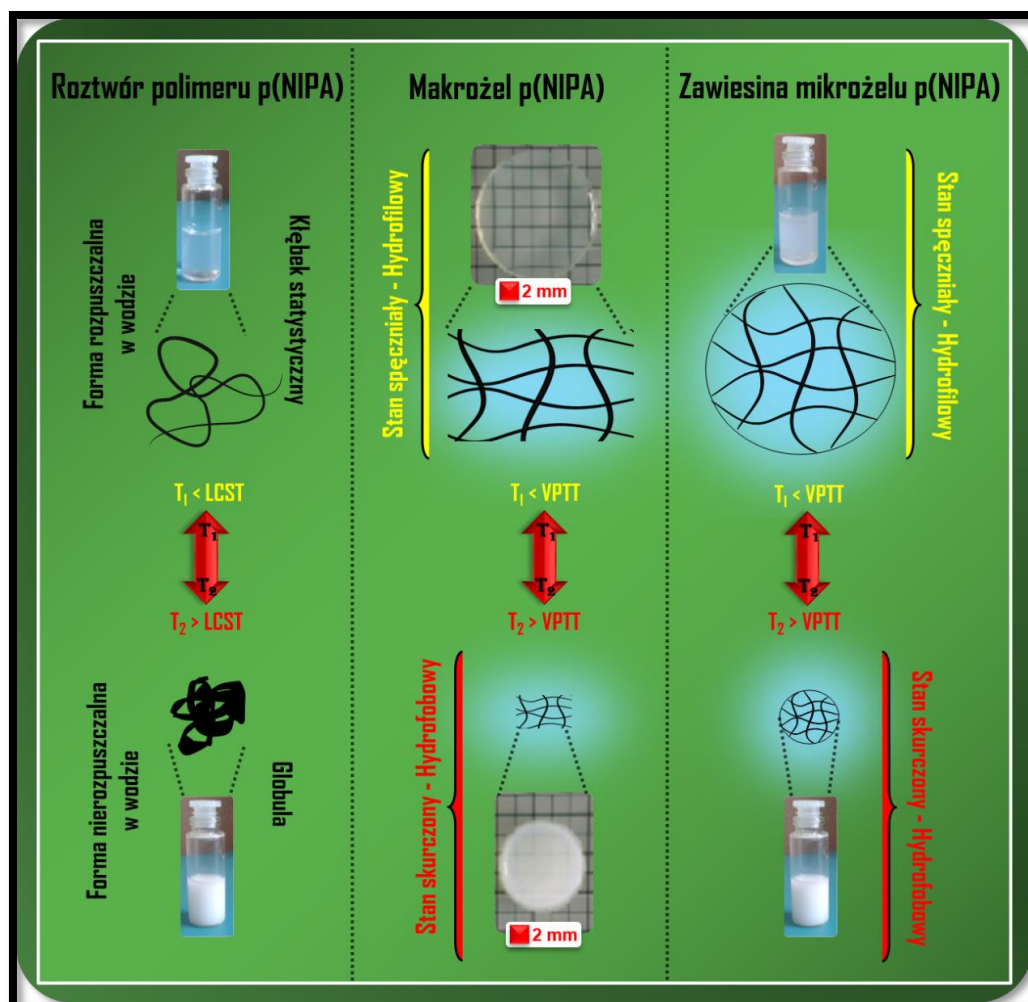
Czułe na temperaturę mikrożele na bazie pNIPA reagują, w sposób odwracalny, na wzrost/spadek temperatury zmniejszeniem/wzrostem rozmiarów (patrz rysunek 10). Mikrożele pNIPA pierwszy raz zostały otrzymane przez Pelton'a i Chibante'a za pomocą polimeryzacji emulsyjnej bez surfaktantów.



**Rysunek 10.** Zależność rozmiaru mikrożelu pNIPAA od temperatury. Rozmiar zmierzylem techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Wraz ze wzrostem temperatury mikrożel ulega przejściu fazowemu ze stanu spęczniałego w stan skurczony. Procesowi temu towarzyszy zmętnienie roztworu.

Rysunek 10 przedstawia indukowane temperaturą kurczenie się przykładowego mikrożelu na bazie polimeru pNIPAA w roztworze wodnym w funkcji temperatury. Czynnikiem sieciującym, za pomocą którego usieciowałem polimer pNIPAA, był *N,N'*-metylenobisakryloadmid. W warunkach otoczenia, rozcieńczona wodna zawiesina mikrożeli pNIPAA jest niemalże całkowicie przezroczysta, ponieważ mikrożele występują w stanie spęczniałym i zazwyczaj składają się z więcej niż 90% wody. Tak więc współczynnik załamania światła (RI) w przybliżeniu odpowiada RI wody. Skurczona sieć polimerowa mikrożelu – na skutek wydalenia/utraty większości wody – staje się bardzo gęsta, współczynnik załamania skurczonego mikrożelu wzrasta i staje się większy niż RI wody; wówczas zawiesina mikrożeli mętnieje, aż w końcu staje się mlecznobiała. Mikrożele pNIPAA o średnicy kilkuset nanometrów wykazują podobne właściwości do ich makrożelowych odpowiedników. Właściwości te dotyczą zdolności pęcznienia i ulegania objętościowemu przejściu fazowemu (VPT) w temperaturze zbliżonej do temperatury LCST polimeru pNIPAA,

czyli ok. 32°C. [121-124]. Na rysunku 11 zobrazowałem porównanie przejścia fazowego polimeru pNIPA oraz makro- i mikrożeli pNIPA.



**Rysunek 11.** Schematyczne przedstawienie indukowanego zmianą temperatury przejścia fazowego polimeru pNIPA oraz makro- i mikro- żeli pNIPA. Diagram nie jest skalowany.

O ile polimer pNIPA przechodzi z formy całkowicie rozpuszczalnej w wodzie (kłębek statystyczny) w formę nierozpuszczalną w wodzie (globula) w temperaturze LCST, o tyle mikrozele pNIPA, podobnie jak makrozele pNIPA, występują w stanie spęczniałym w temperaturze poniżej temperatury VPTT (zbliżonej do temperatury LCST polimeru pNIPA) i kurczą się w temperaturze powyżej VPTT [125]. Mikrozele pNIPA, w odróżnieniu od makrożeli pNIPA, zazwyczaj mają sferyczny kształt, większy obszar powierzchni, mniejszą lepkość, inny jest sposób ich syntezy oraz mają dużo mniejsze rozmiary i, w związku z tym, szybciej reagują na bodźce. Mikrozele pNIPA,

w przeciwieństwie do makrożeli pNIPA, syntezuje się z bardziej rozcieńczonych roztworów monomerów, natomiast polimeryzację przeprowadza się w podwyższonej temperaturze (od 50 do 70°C), aby nie doprowadzić do nieograniczonego wzrostu łańcucha polimerowego.

Właściwości mikrożeli pNIPA, takie jak rozmiar, stopień spęczenia oraz temperatura VPTT, w podobny sposób jak właściwości makrożeli pNIPA, można kontrolować, zmieniając gęstość usieciowania oraz wprowadzając do głównego łańcucha polimerowego mikrożeli, podczas ich syntezy, komonomery, zawierające odpowiednie grupy funkcyjne. Modyfikacje sieci polimerowej mikrożeli prowadzą do otrzymania cząstek czułych na wiele bodźców. Środowiskowo-czułe mikrozele pNIPA mogą reagować na zmiany środowiska, przechodząc ze stanu spęcniałego w stan skurczony. Zmiany te mogą dotyczyć ogrzewania, światła, pH, siły jonowej oraz bardziej specyficznych bodźców, jak na przykład stężenie czynnika redukującego lub stężenie glukozy [105,126]. W celu funkcjonalizacji mikrożeli na bazie pNIPA można także modyfikować samą powierzchnię, wcześniej otrzymanych mikrożeli, monomerami z grupami funkcyjnymi lub można utworzyć w sieci polimerowej mikrożeli inne sieci polimerowe, na zasadzie przenikających się sieci polimerowych [127].

### **4.3. Synteza mikrożeli**

Zmniejszenie rozmiarów hydrożeli z rozmiarów milimetrowych do rozmiarów mikro- lub nanometrowych pozwala uniknąć problemu wolnej reakcji na bodziec. Krótki czas reakcji mikrożeli na bodźce [86] ułatwił badania ich objętościowego przejścia fazowego [80] i poprawił ich atrakcyjność w zastosowaniach. W konsekwencji: w literaturze można spotkać coraz to więcej badań, dotyczących syntezy oraz charakteryzacji koloidalnych mikrożeli [128-130]. W zastosowaniach hydrożeli do systemów dostarczania leków szczególnie pożądane są środowiskowo-czułe hydrozele o małych rozmiarach [131]. W celu otrzymania mikrożeli, podobnie jak makrożeli, należy usieciować polimer, czyli przeprowadzić polimeryzację monomeru w obecności czynnika sieciującego. Czynnikiem sieciującym ma kluczowe znaczenie, ponieważ zapobiega rozpuszczeniu otrzymanego mikrożelu w wodzie. Mimo to polimer

pNIPA, ale także inne polimery, mają tendencję do samodzielnego usieciowania się, gdy polimeryzację prowadzi się z odpowiednio dużych stężeń monomeru. Polimeryzacja wolnorodnikowa samego monomeru NIPA o dużym stężeniu w wodzie, bez dodatku czynnika sieciującego i w temperaturze dużo wyższej niż LCST polimeru pNIPA

(> 32°C), inicjowana za pomocą inicjatora, prowadzi do otrzymania czułych na temperaturę, samoczynnie usieciowanych polimerów. Częstki te, o promieniu kilkuset nanometrów, pod wieloma względami podobne są do usieciowanego za pomocą czynnika sieciującego mikrożelu pNIPA, zsyntezowanego w podobnych warunkach, z wyjątkiem tego, że posiadają mniejszą gęstość, niższą masę cząsteczkową i większy stopień spęczenia. Tworzenie nierozpuszczalnej w wodzie sieci polimerowej spowodowane jest fizycznym splątaniem się łańcuchów polimerowych oraz reakcją przeniesienia łańcucha [100,132]. Reakcje przeniesienia łańcucha są rzadkie, dlatego cząstki żelu bez udziału czynnika sieciującego mają niezwykle niski stopień usieciowania. Gdyby utworzyła się usieciowana struktura polimerowa, a nie jedynie rozgałęziona struktura pojedynczego łańcucha polimerowego, rozmiar mikrożeli i ich masa powinny być duże.

W syntezie mikrożeli stosuje się różnorodne monomery: styren, akryloamid, tert-butyl, metakrylan metylu, kwas metakrylowy oraz *N*-alkiloakryloamidy, takie jak: NIPA, *N*-dietyloakryloamid, *N*-izopropylometakryloamid, i in. oraz środki sieciujące: diwinylobenzen, pochodne dimetakrylanu glikolu etylenowego oraz pochodne metylenobisakryloamidu. W mojej pracy badawczej monomerem wyjściowym do otrzymania mikrożeli był *N*-izopropylakryloamid, natomiast jako czynniki sieciujące stosowałem niedegradowalny BIS oraz degradowalną *N,N'*-bis(akryloilo)cystynę. Dla celów porównawczych syntezowałem także mikrozele pNIPA samoczynnie usieciowane, tzn. bez udziału czynnika sieciującego. Struktury chemiczne monomerów użytych w rozprawie przedstawiłem w rozdziale 8.

Użycie monomeru takiego jak NIPA pozwala na przeprowadzenie polimeryzacji w łagodnym środowisku wodnym, bez użycia rozpuszczalników organicznych oraz bez potrzeby rozdzielania faz. Mikrozele pNIPA, w odróżnieniu od makrożeli pNIPA, syntezuje się z mniej stężonych roztworów monomeru/ów oraz w podwyższonej

temperaturze. Gotoh wykazał, że żełe pNIPA o mniejszych rozmiarach (w skali mikrometrów) i, co za tym idzie, większej szybkości kurczenia, czyli mikrożele pNIPA, można otrzymać, przeprowadzając reakcję polimeryzacji w temperaturach powyżej temperatury LCST polimeru [133].

Istnieje kilka metod otrzymywania mikrożeli. Rodzaj użytej metody syntezy mikrożeli wpływa na ich rozmiary oraz monodispersyjność. Do metod opartych na polimeryzacji stopniowej należy polikondensacja [134]. Do metod opartych na polimeryzacji łańcuchowej należą: polimeryzacja jonowa (kationowa oraz anionowa „polimeryzacja żyjąca”) oraz polimeryzacja rodnikowa [109,135]. Do metod polimeryzacji rodnikowej należą: kontrolowana polimeryzacja rodnikowa (CRP) i polimeryzacja wolnorodnikowa. Do najważniejszych sposobów realizacji polimeryzacji CRP należą techniki polimeryzacji z przeniesieniem atomu (ATRP) oraz z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT) [136]. Do realizacji polimeryzacji wolnorodnikowej najczęściej stosuje się inwersyjną polimeryzację mikro-emulsyjną [102,137] oraz polimeryzację emulsyjną, zwaną polimeryzacją strąceniową [138-141]. W swojej pracy badawczej skupiłem się na mikrożelach bazujących na polimerze pNIPA, zsyntezowanych przy użyciu polimeryzacji emulsyjnej. Opis tej procedury znajduje się w rozdziale 8.

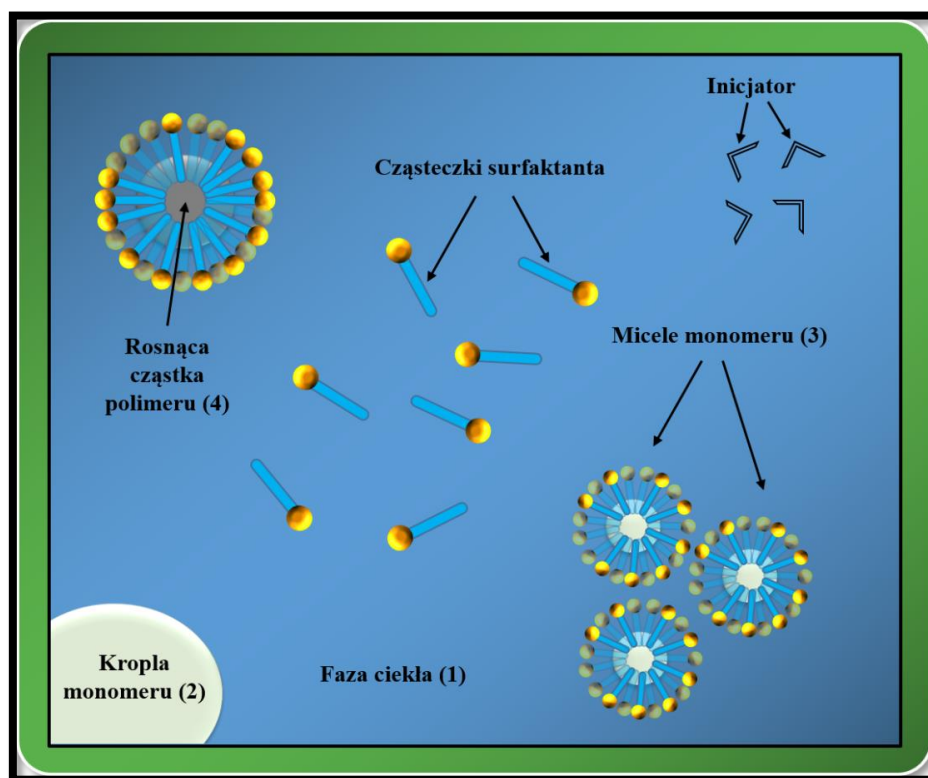
#### **4.3.1. Polimeryzacja emulsyjna**

Polimeryzacja emulsyjna jest najczęściej używaną metodą syntezy mikrożeli, za pomocą której można otrzymać cząstki o wąskim rozkładzie rozmiaru [142]. Polimeryzację emulsyjną można prowadzić w obecności surfaktantów [130,143,144] lub bez ich obecności [97,145-148]. Ta ostatnia zwana jest także polimeryzacją strąceniową [149,150] albo polimeryzacją strąceniową bez udziału surfaktanta (SFPP) [151].

W polimeryzacji emulsyjnej wykorzystuje się rozpuszczalność monomerów w wodzie oraz nierozpuszczalność spolimeryzowanej formy monomerów w wodzie. W celu otrzymania mikrożelu pNIPA przeprowadza się polimeryzację NIPA z czynnikiem sieciującym. Monomery rozpuszcza się w wodzie dejonizowanej

z dodatkiem surfaktanta o niewielkim stężeniu (stężenie dużo poniżej krytycznego stężenia micelnego). Następnie mieszaninę umieszcza się w reaktorze, tj. w kolbie zaopatrzonej w element grzewczy, element mieszający oraz wlot i wylot gazu obojętnego. Surfaktant, np. dodecylosiarczan sodu (SDS), pełni funkcję stabilizatora cząstek mikrożeli i ogranicza ich wzrost. Mieszany i podgrzany (50 – 70°C) roztwór odtlenia się za pomocą gazu obojętnego. Odtlenianie jest konieczne, aby usunąć obecny w mieszaninie reakcyjnej tlen. Tlen jest akceptorem wolnych rodników i może uniemożliwić zajście reakcji polimeryzacji. Po około godzinnym odtlenianiu do medium reakcyjnego można dodać monomery modyfikujące w celu dokonania funkcjonalizacji mikrożelu. Zainicjowanie polimeryzacji następuje po dodaniu inicjatora, np. nadsiarczanu amonu (APS). Po kilku minutach od czasu dodania inicjatora zaczyna zachodzić polimeryzacja i roztwór staje się niebieską zawiesiną, zawierającą cząstki o rozmiarach kilkudziesięciu nanometrów, których rozmiar wzrasta wraz z czasem syntezy. W ciągu kolejnych kilku minut roztwór staje się białą dyspersją, wskazując na tworzenie się dużych cząsteczek. W polimeryzacji emulsyjnej stosuje się różne inicjatory (najczęściej nadsiarczany, na przykład nadsiarczany sodu, potasu i amonu) oraz fazy rozpraszające o wysokiej stałej dielektrycznej (np. woda). Podwyższona temperatura prowadzi do rozpadu inicjatora na rodniki, które reagują z monomerem/ami i czynnikiem sieciującym zapoczątkowując reakcję polimeryzacji. Kiedy w procesie polimeryzacji biorą udział czułe na temperaturę łańcuchy polimerowe, takie jak łańcuchy pNIPA, podwyższona temperatura uniemożliwia nieograniczony wzrost łańcucha polimerowego, prowadzi do wytrącenia rosnących łańcuchów polimerowych z roztworu (na skutek utraty rozpuszczalności polimeru i utworzenia cząstek koloidalnych). Łańcuchy polimerowe powstają wewnątrz miceli utworzonej z cząsteczek surfaktanta (patrz rysunek 12). Po osiągnięciu pewnej krytycznej długości łańcuchy polimerowe zwijają się, tworząc cząsteczki prekursorowe, z których ostatecznie powstają stabilne cząstki mikrożelu. Zwinięte łańcuchy polimerowe są cząsteczkami prekursorowymi, których wzrost prowadzi do powstania stabilnych cząstek mikrożelu. Rozmiar mikrożeli zależy głównie od stężenia surfaktanta w mieszaninie reakcyjnej. Wysokie stężenie surfaktanta prowadzi do otrzymania małych cząstek mikrożeli, natomiast niskie stężenie surfaktanta prowadzi do dużych cząstek mikrożeli.



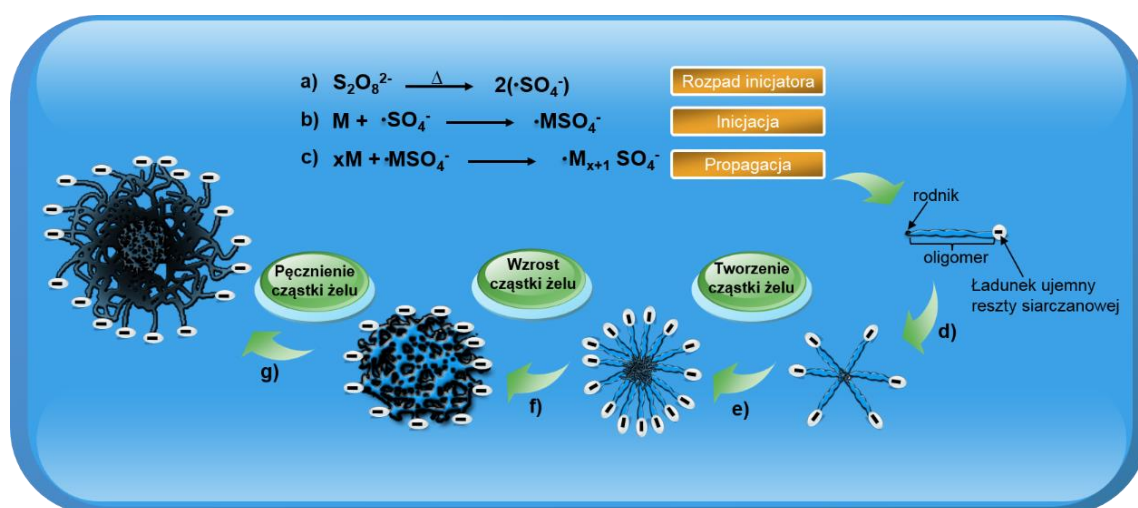


**Rysunek 12.** Schemat polimeryzacji emulsyjnej. Faza ciekła (1), w tym przypadku woda, zawiera rozpuszczony surfaktant oraz inicjator. Po dodaniu monomeru zaczynają tworzyć się krople monomeru (2). Adsorbują one cząsteczki surfaktanta i tworzą micelle (3). Wewnątrz miceli powstają polimerowe cząstki mikrożelu (4).

Tradycyjna polimeryzacja emulsyjna umożliwia otrzymanie bardzo małych cząstek mikrożeli, tj. cząstek o średnicy mniejszej niż 150 nm. Wadą tej metody są trudności w całkowitym usunięciu nadmiaru surfaktanta, który zanieczyszcza otrzymane mikrozele. Dlatego zamiennie stosuje się polimeryzację emulsyjną bez udziału surfaktanta (SFEP – Surfactant Free Emulsion Polymerization). Metoda ta różni się od wcześniejszej metody jedynie brakiem surfaktanta w medium reakcyjnym, przez co otrzymuje się dużo większe cząstki mikrożeli. Podobnie jak wcześniej, w celu przeprowadzenia polimeryzacji monomery rozpuszcza się w rozpuszczalniku, następnie – po podgrzaniu i odtlenieniu mieszaniny – dodaje się inicjatora w celu zapoczątkowania reakcji.

Mechanizm otrzymywania mikrożeli za pomocą metody SFEP przedstawiłem na rysunku 13. Zgodnie z tym mechanizmem, rozpad termiczny jonowego inicjatora

( $S_2O_8^{2-}$ ) rozpoczyna polimeryzację wolnorodnikową (patrz rysunek 13a). Rozpuszczony w wodzie rodnik siarczanowy reaguje z rozpuszczonym w wodzie monomerem i inicjuje wytworzenie łańcucha polimerowego (patrz rysunek 13b). Łańcuch rośnie – propagacja łańcucha (patrz rysunek 13c) – do czasu osiągnięcia długości krytycznej, związanej z przekroczeniem przez łańcuch polimerowy granicy rozpuszczalności w danym rozpuszczalniku. Po osiągnięciu krytycznej długości łańcuch zapada się, stając się koloidalną niestabilną cząstką prekursorową. Cząstki takie albo osadzają się na istniejących, koloidalnie stabilnych cząstkach, albo łączą się z innymi cząstkami prekursorowymi (agregacja), aż do momentu utworzenia wystarczająco dużej stabilnej cząstki koloidalnej.



**Rysunek 13.** Mechanizm otrzymywania mikrożeli z użyciem metody SFEP [17]. Etapy przedstawiają rozpad inicjatora na rodniki (a), zainicjowanie reakcji polimeryzacji (b), propagację łańcucha polimerowego (c), nukleację cząstki (d), agregację cząstek (e), wzrost cząstki (w złym rozpuszczalniku) (f), rozciąganie łańcuchów i pęcznienie cząstki (po ochłodzeniu w dobrym rozpuszczalniku) (g) M – monomer z grupą winylową.

W polimeryzacji SFEP czas nukleacji jest bardzo krótki (rzędu minut), co zapewnia wąski rozkład rozmiarów otrzymywanych cząstek [142]. Synteza mikrożeli pNIPA za pomocą polimeryzacji emulsyjnej bez udziału surfaktanta pozwala na otrzymanie monodispersyjnych koloidalnych cząstek mikrożelu, jednak metodą tą otrzymuje się dużo większe cząstki mikrożeli, o średnicy od 100 do 1000 nm.

#### 4.4. Stabilność koloidalna mikrożeli

Jeżeli wodna zawiesina koloidalna nie agreguje w odpowiednio długim okresie czasu, to można uznać ją za stabilną. Siły przyciągania van der Waals'a pomiędzy cząstkami powodują ich agregację, natomiast siły odpychania elektrostatycznego przeciwdziałają agregacji. Gdy cząstki mikrożeli pNIPA występują w stanie spęczniałym, siły przyciągania van der Waals'a są stosunkowo małe. Ponadto zakończenia łańcuchów polimerowych cząstek mikrożeli stabilizują je sterycznie. Poza tym wprowadzone do łańcuchów polimerowych (podczas ich syntezy) grupy  $\text{SO}_4^-$  (pochodzące od inicjatora) i  $\text{SO}_4^{2-}$  (od surfaktanta) powodują powstanie ładunków elektrostatycznych, które zwiększają stabilność koloidalną mikrożeli w temperaturze poniżej CST. Ładunki te znajdują się na powierzchni cząstek mikrożeli pNIPA i są także odpowiedzialne za stabilność dyspersji mikrożeli, gdy temperatura syntezy jest dużo wyższa niż temperatura CST polimeru pNIPA w wodzie [146]. Przy braku ładunków ujemnych, w podwyższonej temperaturze (zawartość wody w mikrożelach jest niska a ich gęstość większa) następuje zwiększenie sił van der Waals'a, a to prowadzi do agregacji mikrożeli.

#### 4.5. Metody używane do charakteryzacji mikrożeli

W literaturze można znaleźć szereg metod ukierunkowanych na badanie morfologii, parametrów termodynamicznych, rozmiarów, przejść fazowych i struktury mikrożeli. Należą do nich: spektroskopia IR [152], rozpraszanie światła [139], kalorymetria, w tym różnicowa kalorymetria skaningowa [146,153], fluorymetria [154,155], niskokątowe rozpraszanie neutronów [156], spektrofotometria UV-Vis, turbidymetria UV [157,158], wiskozymetria [20,35,41], reologia [156], spektroskopia  $^1\text{H}$  NMR [159,160], chromatografia żelowa [161], ultrawierowanie [162], miareczkowanie potencjometryczne i konduktometryczne [163], rozpraszanie promieni rentgenowskich lub neutronów pod małymi kątami (odpowiednio SAXS lub SANS) [164] oraz obserwacja bezpośrednia [13]. Najczęściej używanymi technikami eksperymentalnymi do charakteryzacji mikrożeli są: mikroskopia elektronowa oraz rozpraszanie światła. Można wyróżnić dynamiczne (DLS) oraz statyczne (SLS) rozpraszanie światła. Techniki te różnią się sposobem wykonania eksperymentów oraz dają różne, lecz

uzupełniające się informacje na temat cząstek mikrożelowych. Wspólne dla obydwu technik jest źródło światła laserowego oraz fotodiody do detekcji rozproszonego światła, na przykład fotodioda lawinowa [165,166]. W technice SLS rozcieńczony roztwór mikrożeli oświetla się światłem laserowym. Cząstki mikrożeli rozpraszają światło we wszystkich kierunkach. Detektor rejestruje natężenie rozpraszanego światła w wybranym kierunku i na podstawie uzyskanego wyniku można określić masę cząsteczkową, a także kształt cząstek mikrożeli. Masa cząsteczkowa określana jest z wyników pomiarów próbki w różnych stężeniach i zastosowania równania Rayleigh'a [167].

Równanie Rayleigh'a ma postać:

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left( \frac{1}{M} + 2A_2C \right) P_\theta \quad 31$$

gdzie:  $M$  to masa cząsteczkowa próbki,  $R_\theta$  – współczynnik Rayleigh'a: stosunek światła rozpraszanego do światła padającego,  $A_2$  – drugi współczynnik wirialny,  $C$  – stężenie,  $P_\theta$  – parametr zależny od kąta rozpraszania próbki i  $K$  – stała optyczna zdefiniowana jako:

$$K = \frac{2\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left( n_0 \frac{dn}{dc} \right) \quad 32$$

gdzie:  $N_A$  to stała Avogadro,  $\lambda_0$  – długość fali,  $n_0$  – współczynnik załamania światła rozcieńczalnika, a  $\frac{dn}{dc}$  to różnicowy przyrost współczynnika załamania światła rozcieńczalnika, lub precyzyjniej: pochodna współczynnika załamania światła względem stężenia. Dla wielu kombinacji próbka/roztwór pochodną tę można znaleźć w literaturze. Dla nietypowych kombinacji,  $dn/dc$  może zostać zmierzony przy użyciu refraktometru różnicowego.

Parametr  $P_\theta$  w równaniu Rayleigh'a opisuje zależność natężenia rozpraszania próbki od kąta rozpraszania. Zależność od kąta powstaje wskutek nakładania się fal światła (w fazie i przeciwfazie), rozpraszanych przez różne krawędzie tej samej cząstki. Zjawisko to – znane jako rozpraszanie Mie – zachodzi dla wystarczająco dużych

cząstek, takich, by mogło zachodzić rozpraszanie wielofotonowe. Jednak, kiedy cząstki w roztworze są znacznie mniejsze od długości fali padającego światła, nie będzie dochodzić do rozpraszania wielofotonowego. W takim przypadku  $P_\theta$  spada do 1 i zanika zależność kątowa natężenia rozpraszania. Ten typ rozpraszania znany jest jako rozpraszanie Rayleigh'a. Stąd można postulować, że jeśli cząstka jest mała, można założyć rozpraszanie Rayleigh'a i zastosować przybliżenia Rayleigh'a. Natężenie rozpraszane przez cząstkę światła jest proporcjonalne do iloczynu uśrednionej wagowo masy cząsteczkowej i stężenia. Kolejnym etapem w wyznaczaniu masy cząsteczkowej jest pomiar natężenia rozpraszanego światła ( $\frac{KC}{R_\theta}$ ) przy różnych stężeniach próbki (C) pod jednym kątem. Otrzymane wyniki są porównywane z rozpraszaniem światła na wzorcu (np. toluenie). Graficzna reprezentacja nazywana jest wykresem Debye'a i pozwala na określenie zarówno bezwzględnej masy cząsteczkowej, jak i 2-giego współczynnika wirialnego. Jeśli znana jest już masa cząsteczkowa i objętość właściwa (odwrotność gęstości), to przy pomocy odpowiednich funkcji można także oszacować kształt i konformację cząstki. Im cząstka jest bardziej kulista, tym bardziej zbliżona będzie średnica, obliczona na podstawie masy do średnicy zmierzonej metodą DLS. Różnica między tymi dwiema wartościami opisana jest w teorii Perrin'a [167]. Do oceny kształtu niekulistych cząstek można posłużyć się współczynnikiem Perrin'a, czy inaczej współczynnikiem kształtu ( $F$ ). Współczynnik Perrin'a określony jest jako stosunek współczynnika tarcia kuli o tej samej objętości, co mierzona cząstka, do współczynnika tarcia kuli o tej samej masie, co mierzona cząstka. Wyrażony jest jako:

$$F = \frac{f_{Vol}}{f_{Mass}} = \frac{6\pi\eta D_{Vol}}{6\pi\eta D_{Mass}} = \frac{D_{Vol}}{D_{Mass}} = \frac{D_H}{D_{Mass}} \quad 33$$

gdzie:  $D_H$  to średnica hydrodynamiczna mierzona metodą DLS,  $D_{Mass}$  – średnica masowa obliczana w oparciu o masę cząsteczkową i objętość właściwą cząstki,  $f$  – współczynnik tarcia cząstki i  $\eta$  – lepkość rozcieńczalnika.

Kalkulator szacowania kształtu pobiera dane wejściowe, a następnie stosuje dwa równania – Stokes'a-Einstein'a (patrz rozdział 7.2) i współczynnik Perrin'a.

Technika dynamicznego rozpraszania światła (DLS), zwana także spektroskopią z korelacją fotonową (Photon Correlation Spectroscopy – PCS) dostarcza informacji na temat średnicy hydrodynamicznej cząstek w rozcieńczonych roztworach. Stosuje się pomiar fluktuacji natężenia rozpraszanego światła w funkcji czasu. Analizując rozpraszanie światła przez cząstki mikrożeli, zawieszone w podgrzewanym roztworze wodnym, można śledzić postęp indukowanego zmianą temperatury objętościowego przejścia fazowego mikrożeli pNIPA dzięki śledzeniu zmiany rozmiaru/średnicy hydrodynamicznej mikrożeli w funkcji temperatury. Intensywność rozpraszania światła przez napęczniałe cząstki mikrożeli jest mała. Drastyczny wzrost intensywności rozpraszania światła następuje po przekształceniu mikrożeli w mlecznobiałą dyspersję. Na podstawie fluktuacji natężenia rozpraszanego światła w czasie, wykreślana jest funkcja korelacyjna. Do rozkładu tej funkcji dopasowany jest algorytm, związany ze współczynnikiem dyfuzji cząstek, poruszających się na skutek ruchów Brown’a. Przy użyciu równania Stokes’a-Einsteina, znając współczynnik dyfuzji, można określić promień cząstek. Szczegóły obliczeniowe tej techniki eksperymentalnej przedstawiłem w rozdziale 7.2.

Do zbadania morfologii mikrożeli używa się szeregu technik. Zazwyczaj stosuje się skaningową oraz transmisyjną mikroskopię elektronową (SEM oraz TEM), w tym niskotemperaturową skaningową mikroskopię elektronową (CryoSEM) i niskotemperaturową transmisyjną mikroskopię elektronową (CryoTEM), a także mikroskopię sił atomowych (AFM). Wymienione techniki mikroskopowe dostarczają cennych informacji na temat struktury badanych układów oraz takich parametrów, jak rozmiar, kształt i gładkość powierzchni. Pozwalają również na zbadanie próbki pod względem jej homogeniczności i jednorodności. Na podstawie zdjęć TEM można uzyskać informacje nie tylko o kształtach i rozmiarach, ale także o wewnętrznej strukturze cząstek. Można wnioskować o gęstości sieci polimerowej mikrożeli i wykryć różnice w jej gęstości, w tym ewentualne obiekty typu rdzeń-otoczka, w których rdzeń i otoczka mają różną gęstość. Ponieważ mikrozele zawierające w sieci polimerowej miejsca anionowe, np. grupy karboksylowe, udaje się „zabarwić” przy pomocy takich barwników, jak octan uranylu lub kwas fosforowolframowy, można zobrazować rozkład anionowych grup funkcyjnych w sieci polimerowej. Wymienione powyżej „barwniki” oddziałują elektrostatycznie z miejscami anionowymi, powodując na

zdjęciach różnice w kontraście. Selektywnie „zabarwione” miejsca anionowe ujawniają się jako ciemniejsze miejsca na zdjęciach. Stosując technikę CryoTEM nie ma potrzeby barwienia cząstek. CryoTEM pozwala na obserwację mikrożeli w stanie spęczniałym in situ i idealnie wpasowuje się do badania mikrożeli o budowie typu rdzeń-otoczka. Technika (AFM) dostarcza informacji na temat ukształtowania powierzchni mikrożeli, jak i jej właściwości fizycznych, takich jak: miękkość – Moduł Younga, rozkład ładunku elektrostatycznego i przewodność termiczna. Metody używane do charakteryzacji mikrożeli przedstawiłem w tabeli 1. Łączenie ze sobą różnych metod charakteryzacji mikrożeli prowadzi do pełnego „obrazu” ich właściwości.

Technika Eksperymentalna	Pomiar	Odnosnik
Mikroskopia sił atomowych	Morfologia powierzchni	[121]
Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)	Rozmiar oraz kształt cząstek	[97,128]
Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	Rozmiar oraz kształt cząstek	[129,144]
Chromatografia żelowa	Ciężar cząsteczkowy	[161]
Ultrawiórowanie	Ciężar cząsteczkowy	[162]
Metody z wykorzystaniem reometru	Właściwości reologiczne	[146]
Metody turbidymetryczne	Stabilność dyspersji mikrożeli	[145]
Miareczkowanie potencjometryczne oraz konduktometryczne	Ładunek powierzchniowy	[163,186]
Rozpraszanie neutronów pod małymi kątami (SANS)	Struktura wewnętrzna	[164]
Rozpraszanie promieni rentgenowskich pod małymi kątami (SAXS)	Struktura wewnętrzna	[164]
Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)	Właściwości termodynamiczne	[146,153]
Statyczne rozpraszanie światła (SLS)	Masa cząsteczkowa	[101,161]
Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)	Promień hydrodynamiczny	[121,102]

**Tabela 1.** Techniki eksperymentalne używane do charakteryzacji mikrożeli.

#### 4.6. Czynniki środowiskowe wywołujące przejścia fazowe mikrożeli na bazie pNIPAA

Aby uwrażliwić mikrozele pNIPAA na specyficzne bodźce, można je zmodyfikować odpowiednimi grupami funkcyjnymi. Środowiskowo-czułe mikrozele reagują zmianą swoich rozmiarów/stopnia napężnienia w odpowiedzi na zmiany warunków otoczenia. W zależności od tego, jakie dodatkowe grupy funkcyjne znajdują się w sieci

polimerowej mikrożeli, mikrozele stają się wrażliwe na odpowiednie bodźce. Poniżej opisałem wpływ niektórych bodźców środowiskowych na właściwości mikrożeli na bazie polimeru pNIPA.

#### **4.6.1. Wpływ temperatury**

W środowisku wodnym w  $T < VPTT$  sferyczne cząstki mikrożeli pNIPA mają duże rozmiary, ponieważ występują w stanie spęczniałym, bogatym w rozpuszczalnik, natomiast w  $T > VPTT$  rozmiar cząstek mikrożeli zmniejsza się, mikrozele ulegają dehydratacji, przechodząc w stan skurczony. Temperatura VPTT mikrożeli pNIPA jest nieznacznie wyższa od temperatury LCST liniowego polimeru pNIPA [168]. Spowodowane jest to obecnością czynnika sieciującego w mikrożelach.

W  $T > VPTT$  obszary mikrożelu, zawierające dłuższe łańcuchy polimerowe, kurczą się wcześniej z powodu większych sił hydrofobowych; krótsze łańcuchy polimerowe, o słabszych oddziaływaniach hydrofobowych, kurczą się później. Dlatego też różne obszary mikrożelu ulegają przejściu fazowemu w nieco innych temperaturach. Temperaturę VPTT mikrożeli opartych na pNIPA można zmieniać, stosując kopolimeryzację monomeru głównego NIPA z innymi monomerami, zawierającymi inne grupy funkcyjne. Zmianie ulega równowaga hydrofobowo-hydrofilowa w sieci polimerowej mikrożelu i w konsekwencji tego zmienia się temperatura VPTT.

Zazwyczaj wprowadzenie do sieci polimerowej grup hydrofilowych powoduje wzrost VPTT, z jednoczesnym rozszerzeniem przedziału temperatury, w którym mikrożel ulega skurczeniu. Wyższa temperatura jest potrzebna do zerwania większej liczby wiązań wodorowych pomiędzy tymi grupami a cząsteczkami wody. Obecność grup hydrofobowych daje efekt odwrotny, tj. zmniejszenie temperatury VPTT. Modyfikację temperatury objętościowego przejścia fazowego mikrożeli pNIPA oraz innych żeli, opartych na *N*-alkiloakryloamidach, można uzyskać nie tylko za pomocą kopolimeryzacji monomeru pNIPA z innymi monomerami [155,169], ale także za pomocą dodawania do wodnej zawiesiny mikrożeli: soli [170,171], innych rozpuszczalników [34], surfaktantów [170,172]. Ponadto, podobnie jak w przypadku



polimeru pNIPA, temperatura VPTT mikrożeli pNIPA zależy od masy cząsteczkowej mikrożelu.

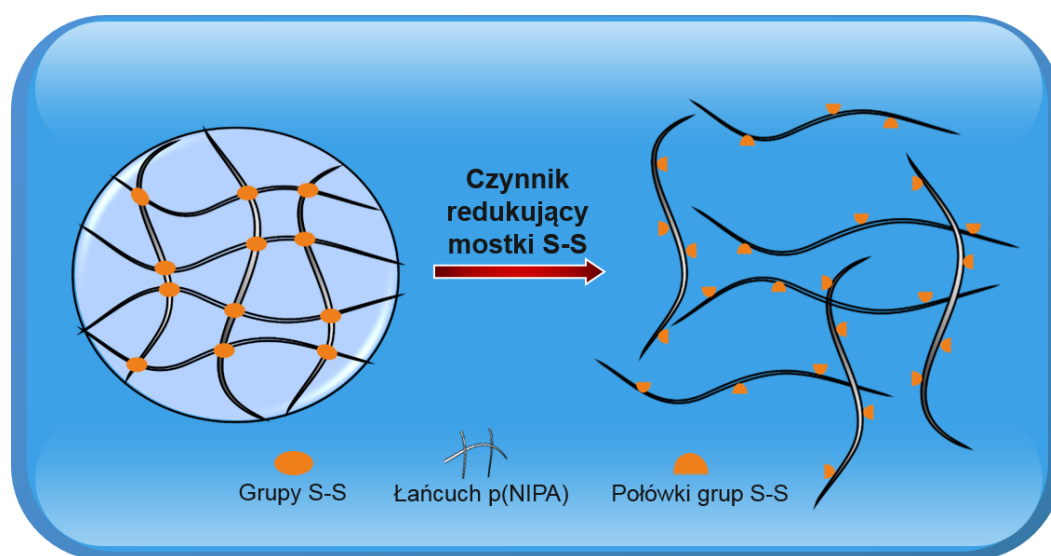
#### 4.6.2. Wpływ pH

Kopolimeryzacja monomeru NIPA z monomerami jonowymi, takimi jak kwas akrylowy [124], kwas metakrylowy [173], winylopirydyna [174,175] oraz winyloimidazol [176], prowadzi do otrzymania mikrożeli, w sieci polimerowej których znajdują się dodatkowe grupy funkcyjne, nadające mikrożelom wrażliwość na bodźce inne niż temperatura. Wrażliwe na pH mikrozele można syntezować, wprowadzając do nich kwasowe albo zasadowe grupy funkcyjne. Na przykład funkcjonalizacja mikrożeli pNIPA grupami karboksylowymi, w celu dodania czułości na pH, możliwa jest za pomocą polimeryzacji monomeru NIPA z komonomerem – słabym kwasem organicznym z grupą akrylową. Może to być kwas akrylowy (AAc) lub metakrylowy (MAA). Otrzymany polielektrolityczny mikrożel ulega objętościowemu przejściu fazowemu w odpowiedzi na zmiany nie tylko temperatury, ale również pH i siły jonowej. Pęcznienie/kurczenie się polielektrolitycznych mikrożeli pod wpływem zmiany pH lub siły jonowej jest skutkiem zmian sił oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy zjonizowanymi karboksylowymi grupami bocznymi wewnątrz sieci polimerowej. Gdy grupy boczne są zjonizowane, sieć polimerowa przechodzi ze stanu skurczonego w stan spęczniały. Przykładowo, mikrozele p(NIPA-AAc) gwałtownie zwiększają swoje rozmiary w zakresie pH powyżej  $pK_a$  kwasu akrylowego ( $pK_a = 4.25$ , [177]) na skutek dysocjacji grup karboksylowych i wzrostu sił odpychania elektrostatycznego pomiędzy zjonizowanymi ujemnie grupami karboksylowymi [100,178,179]. Gdy układ znajduje się w środowisku o pH niższym od 4.25, grupy kwasowe są sprotonowane i utrzymują sieć w stanie skurczonym.

Niezależnie, wraz ze wzrostem ilości AAc w sieci polimerowej mikrożelu, rozmiar cząstek wzrasta, wzrastają elektrostatyczne odpychania między łańcuchami a VPTT przesuwa się w stronę wyższych temperatur [179,180]. Gdy do sieci polimerowej wprowadzone zostaną zasadowe grupy boczne, na przykład aminy pierwszorzędowe, drugorzędowe lub trzeciorzędowe, w kwaśnym pH nastąpi ich sprotonowanie i sprzyjać to będzie napęcznieniu żelu.

### 4.6.3. Wpływ potencjału redoks

Poprzez użycie do syntezy mikrożeli czynników sieciujących zawierających grupy red-ox, na przykład mostki disiarczkowe, można uwrażliwić mikrożel na działanie utleniaczy i reduktorów. Utlenienie lub redukcja mostków disiarczkowych spowoduje ich zrywanie i prowadzi najpierw do rozluźnienia struktury mikrożelu, a następnie do jego degradacji. W literaturze opisanych jest kilka mikrożeli zdolnych do degradowania się. Usieciowane są za pomocą komercyjnie dostępnej *N,N'*-bis(akryloilo)cystaminy (BAC) [105-107]. Redukcja mostków disiarczkowych w tym czynniku sieciującym za pomocą ditiotritolu prowadzi do degradacji mikrożelu (patrz rysunek 14).



**Rysunek 14.** Schemat przedstawiający degradację mikrożelu usieciowanego za pomocą czynnika zawierającego mostki disiarczkowe. Rozpad mostków disiarczkowych po ich redukcji prowadzi do dezintegracji sieci polimerowej mikrożelu.

### 4.6.4. Wpływ rozpuszczalnika

Na VPTT mikrożeli pNIPA ma również wpływ rodzaj rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników (właściwości oraz skład), w którym/której zawieszone są cząstki mikrożelu. Wpływ rozpuszczalników na nieusieciowany i nieżelowany polimer pNIPA opisałem w rozdziale 2. W różnych rozpuszczalnikach polimer pNIPA wykazuje różną rozpuszczalność [181]. Zmiana rozpuszczalnika w żelach głównie prowadzi do zmian temperatury przejścia fazowego oraz stopnia spęczenia. W mieszaninie woda-

metanol temperatura przejścia fazowego żelu pNIPA zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia metanolu aż do 55%. Po przekroczeniu 55% temperatura przejścia fazowego mikrożelu gwałtownie wrasta [182]. Polimer pNIPA rozpuszcza się w obu rozpuszczalnikach i żele pęcznią w nich. Jednak mieszanina wody i alkoholu jest już złym rozpuszczalnikiem [183-185]. W mieszaninie tej polimer nie rozpuszcza się, a żele pNIPA kurczą się. Wang i współpracownicy wykazali, że tradycyjny pNIPA mocniej oddziałuje z cząsteczkami alkoholu niż z cząsteczkami wody [183]. Dla mikrożeli efekt ten, jako pierwsi, zaobserwowali McPhee oraz współpracownicy [186]. Mieszanina alkohol/woda jest złym rozpuszczalnikiem z powodu tworzenia różnych połączeń pomiędzy cząsteczkami tych rozpuszczalników. Tworzą się m.in. czworościenne układy cząsteczek wody otaczających cząsteczki alkoholu, tzw. klatraty/hydraty a zanikają sieci wiązań wodorowych charakterystycznych dla czystej wody i czystego alkoholu. W wodnej zawieszynie mikrożeli cząsteczki wody zlokalizowane są dookoła hydrofobowych grup izopropylowych oraz tworzą wiązania wodorowe z grupami amidowymi łańcuchów polimeru pNIPA. Dodanie alkoholu skutkuje oderwaniem cząsteczek wody solwatujących polimerową sieć mikrożelu i utworzeniem klatratów. Zrywane są istniejące wiązania wodorowe z grupami amidowymi, zaczynają dominować oddziaływania hydrofobowe pomiędzy grupami izopropylowymi i następuje kurczenie mikrożelu. Przy większym udziale objętościowym alkoholu, kiedy nie ma już cząsteczek wody do tworzenia nowych klatratów, alkohol zaczyna oddziaływać z niemi polimeru pNIPA w sposób bezpośredni; następuje zwiększenie oddziaływań polimer-rozpuszczalnik i mikrożel zaczyna ponownie pęcznieć.

#### **4.6.5. Wpływ siły jonowej**

Ciekła woda posiada charakterystyczną strukturę zwaną „iceberg”. Obecność substancji jonowych wywołuje zmiany w tej strukturze. Frank oraz Wen [187] na podstawie analizy numerycznej entropii hydratacji zaproponowali model struktury wody w obecności substancji jonowych. W modelu tym w zależności od rodzaju jonu struktura wody oparta o wiązania wodorowe była zniszczona lub zachowana.

Do opisu zmian w strukturze wody stosuje się często wzór 34. We wzorze tym zmiana lepkości względnej wodnych roztworów elektrolitu opisana jest, jako funkcja stężenia elektrolitu. Wzór nosi nazwę równania Jonesa-Dole [188,189].

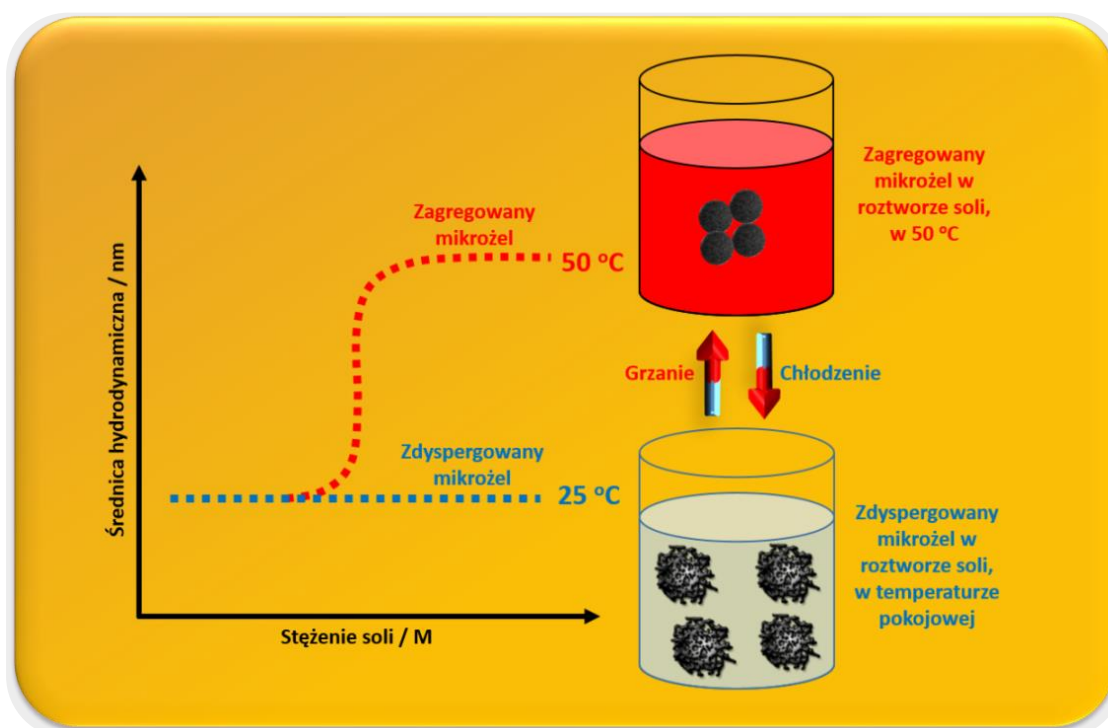
$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + Ac^{\frac{1}{2}} + Bc + Dc^2 \quad 34$$

gdzie:  $\eta$  oraz  $\eta_0$  to odpowiednio współczynniki lepkości roztworu soli oraz rozpuszczalnika/wody w takiej samej temperaturze.  $A$  to stała, która zależy od sił coulombowskich; stała ta jest zawsze dodatnia i można ją obliczyć teoretycznie.  $B$  to parametr zależny od rozmiaru jonów soli i jest on miarą zdolności jonów do zrywania wiązań wodorowych. Współczynnik  $B$  danego jonu w określonym rozpuszczalniku oraz w danej temperaturze ma wartość stałą i jest wielkością addytywną, co oznacza, że współczynnik  $B$  elektrolitu jest sumą poszczególnych współczynników  $B$  jonów obecnych w roztworze. Parametr  $D$  stosuje się dla wyższych stężeń elektrolitów ( $> 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ); zazwyczaj jest on wielkością dodatnią i związany jest z asocjacją rozpuszczalnik-rozpuszczalnik.

Wartości współczynnika  $A$  wielu soli są zazwyczaj mniejsze niż wartości współczynnika  $B$ . Człon  $A$  ma wpływ na wartość lepkości jedynie dla  $c < 0.05 \text{ mL L}^{-1}$ , chociaż nawet i w takim przypadku człon  $B$  zazwyczaj jest członem dominującym [189]. Współczynnik  $B$  w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  dla jonów wykazujących silne oddziaływanie z wodą ma wartość dodatnią, natomiast dla jonów wykazujących słabsze oddziaływanie z cząsteczkami wody (niż oddziaływanie między samymi cząsteczkami wody) przyjmuje wartości ujemne. Wartości współczynnika  $B$  dla różnych jonów można znaleźć, na przykład, w monografii [190].

Dla jonów soli o ujemnej wartości współczynnika  $B$  mikrozele pNIPA występują w stanie spęczniałym (na skutek stabilizacji procesu hydratacji łańcuchów polimerowych), a przejście fazowe mikrożelu pojawia się przy wyższych temperaturach. W przypadku dodania do zawiesiny mikrożeli pNIPA jonów soli o dodatniej wartości współczynnika  $B$ , mikrozele występują w stanie skurczonym i przejście fazowe pojawia się w obszarze niższych temperatur [28,191].

Uogólniając problem, można powiedzieć, że rodzaj soli oraz jej stężenie wpływa na rozmiary, temperaturę VPTT oraz stabilność koloidalną zawiesiny mikrożeli pNIPA [192]. Dodanie do zawiesiny mikrożeli pNIPA niewielkiej ilości soli, np. NaCl, prowadzi do zmniejszenia się rozmiarów mikrożeli oraz ich temperatury VPTT. W miarę wzrostu stężenia soli, oprócz zmniejszenia się rozmiarów mikrożeli można także zauważyć, że gdy podnosimy temperaturę mikrozele tracą stabilność; agregują i tworzą cząstki o znacznie większych rozmiarach. Saunders i współpracownicy jako pierwsi zauważyli, że podczas wzrostu temperatury oraz w środowisku o określonej sile jonowej cząstki mikrożelu pNIPA zaczynają agregować/flokulować [193]. Temperatura, przy której mikrożel pNIPA zaczyna tracić swoją stabilność i ulega flokulacji, czyli strącaniu się w postaci kłacek jest zazwyczaj zbliżona do temperatury VPTT mikrożeli i zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia soli (patrz rysunek 15). W przypadku dużych rozmiarów żelu pNIPA (rzędu milimetrów i więcej) odpowiedni wzrost stężenia soli wywołuje objętościowe przejście fazowe.



**Rysunek 15.** Zobrazowanie początkowego etapu zjawiska flokulacji mikrożeli w roztworze soli w podwyższonej temperaturze i wykres odpowiednich zmian średnicy hydrodynamicznej żeli dla tego procesu.

Jony zdysocjowanej soli mają wpływ na uporządkowanie cząsteczek wody otaczających łańcuchy polimerowe pNIPA. Obecność jonów elektrolitu prowadzi do zrywania wiązań wodorowych. Udział soli w zrywaniu wiązań wodorowych zależy od jej rodzaju i stężenia (patrz szereg Hofmeistera; rozdział 2). Z termodynamicznego punktu widzenia jony zdysocjowanego elektrolitu mają wpływ na entropię układu. Inaczej mówiąc, obecność jonów ma wpływ na zmianę wartości parametru  $\chi$  w teorii Flory-Rehner'a. Wielkość zmiany tego parametru zależy od miejsca soli w szeregu Hofmeistera. Park oraz Hoffman [194] badali szereg soli sodowych i zauważyli, że największy wpływ na przejście fazowe żeli pNIPA miał jon chlorkowy.

Jedynie mikrozele pNIPA, zawierające w sieci polimerowej zjonizowane grupy funkcyjne, na przykład grupy karboksylowe, są wysoce odporne na flokulację. Wzrost siły jonowej środowiska, w którym znajdują się takie zjonizowane mikrozele, poprzez wprowadzenie do wodnej zawiesiny mikrożeli soli nieorganicznej powoduje jedynie zmniejszenie rozmiarów mikrożeli oraz zmniejszenie temperatury VPTT. Wraz ze wzrostem stężenia soli temperatura VPTT zmniejsza się. Obecność soli skutkuje ekranowaniem sił odpychania elektrostatycznego pomiędzy grupami karboksylowymi w sieci polimerowej mikrożelu, co prowadzi do skurczenia mikrożelu [193]. Dla mikrożeli ze zjonizowanymi grupami funkcyjnymi w sieci polimerowej flokulacja pojawia się dopiero przy bardzo dużych stężeniach soli.

## **4.7. Kompozytowe/hybrydowe mikrozele**

Aby uzyskać poszerzone właściwości materiałów, w porównaniu do materiałów jednoskładnikowych, próbuje się wytwarzać kompozyty. Wprowadzenie funkcjonalnych nanostruktur, składających się z półprzewodników, metali szlachetnych, biominerałów, polimerów przewodzących oraz tlenków metali, do polimerowych mikrożeli prowadzi do otrzymania hybrydowych materiałów, o bardziej zaawansowanej strukturze oraz nowych, funkcjonalnych właściwościach [195]. Połączenia żeli z powyższymi strukturami zazwyczaj prowadzą do nadania otrzymanym kompozytom właściwości charakterystycznych dla ich komponentów. Na przykład, hydrozele zazwyczaj nie przewodzą prądu elektrycznego, podczas gdy w takich zastosowaniach, jak superkondensatory, ogniwa paliwowe oraz sensory, przewodnictwo ich jest

niezbędne [196-198]. To zwiększone przewodnictwo czułych na bodźce, zwykłych mikrożeli można osiągnąć poprzez wprowadzenie do nich drugiego składnika, takiego jak: przewodzący polipirol (PPy), nanocząstki metali oraz nanocząstki grafitu [199-201].

W literaturze można spotkać połączenia mikrożeli z nanocząstkami metali szlachetnych, takimi jak Pt, Au oraz Ag. Otrzymane hybrydowe mikrozele posiadają właściwości typowe dla mikrożeli, czyli szybką reakcję na bodźce środowiskowe, oraz właściwości katalityczne i przewodnictwo typowe dla nanocząstek metali. Kompozyty zawierające polimery przewodzące, charakteryzują się typową dla polimerów trwałością i odpornością chemiczną, a także bardzo dobrym przewodnictwem.

W literaturze można spotkać kilka artykułów na temat syntezy kompozytów żel/polimer przewodzący [202,203]. Istnieje także kilka publikacji na temat otrzymywania mikrokompozytów żel/polimer przewodzący. Lin i Chiu syntezyowali czuły na temperaturę oraz przewodzący kompozyt polipirol/poli(*N*-izopropylakryloamid-kwas akrylowy) [204]. Polipirol wprowadzono również do mikrożeli poli(*N*-winylokaprolaktam-acetyloacetoksyetylometakrylan) [205]. Lopez-Cabarcos i in. otrzymali kompozyt mikrożeli pNIPA z polipirolem [206]. Mikrokompozyt składał się z rdzenia wykonanego z mikrożelu pNIPA oraz z powłoki wykonanej z polipiorolu, jednak nie wykazywał objętościowego przejścia fazowego.

Hybrydowe/kompozytowe mikrozele znajdują zastosowanie m.in. w opartej na szablonie syntezie nanocząstek, w otrzymywaniu kryształów fotonicznych, w czułych na bodźce środowiskowe urządzeniach elektrycznych oraz sensorycznych urządzeniach optycznych [207-209].

#### **4.7.1. Polimery przewodzące**

Polimery przewodzące są to związki zawierające układy sprzężonych wiązań podwójnych w łańcuchu głównym. Posiadają przewodnictwo elektryczne zbliżone do metali. Obecność sprzężonych wiązań podwójnych powoduje nakładanie się zdelokalizowanych orbitali  $\pi$  i w ten sposób umożliwia przemieszczanie się ładunku wzdłuż łańcucha polimeru. Jednak obecność tylko układu sprzężonych wiązań

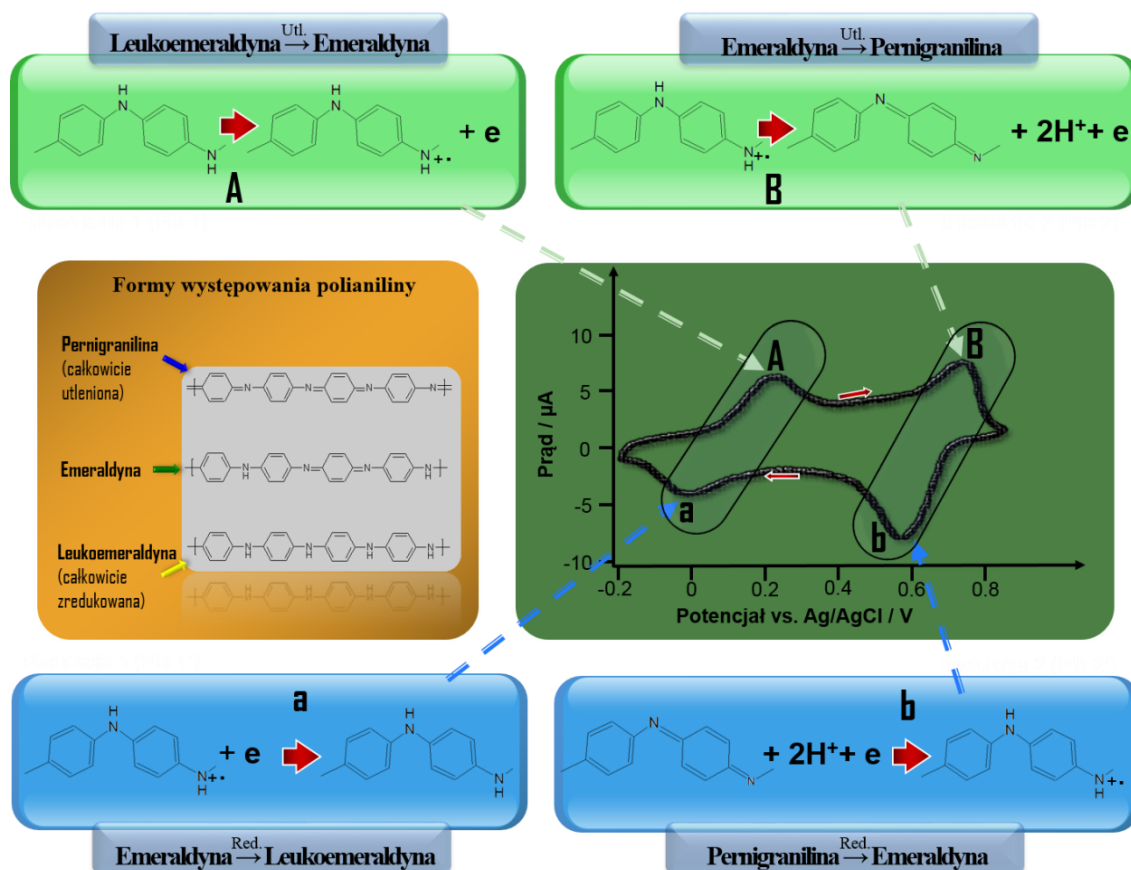
podwójnych nie jest wystarczająca do otrzymania dobrego przewodnictwa. Aby zwiększyć przewodnictwo polimerów, należy je utlenić lub zredukować celem wprowadzenia do nich dodatkowych nośników ładunku (elektronów lub dziur elektronowych). Zasada elektroobojętności spowoduje, że w polimerze będą musiały znaleźć się również przeciwjony. Eksperymentator tak może zaplanować utlenianie/redukcję, aby uzyskać domieszkowanie odpowiednim przeciwjonem [210]. Zwiększenie przewodnictwa polimeru może wynieść od kilku do kilkunastu rzędów wielkości.

Do najbardziej znanych polimerów przewodzących, charakteryzujących się dużą trwałością i odpornością chemiczną, należą m.in. polipiol (PPy), polianilina (PANI) oraz politiofen (PTh) [211]. Polimery te nie rozpuszczają się ani w roztworach wodnych, ani rozpuszczalnikach organicznych.

**Polianilina (PANI).** PANI jest bardzo interesującym oraz najczęściej używanym polimerem przewodzącym. Wynika to z dobrej stabilności/trwałości środowiskowej, prostej syntezy, dobrej podatności na obróbkę oraz przewodnictwa elektrycznego kontrolowanego za pomocą protonowania/deprotonowania [212]. Polimeryzację aniliny w celu otrzymania polianiliny najczęściej przeprowadza się za pomocą utleniania monomeru przy użyciu czynnika utleniającego, na przykład nadsiarczanu amonu [213]. Średnica nanowłókien polianiliny zależy od zdolności czynnika utleniającego do utleniania; im większy potencjał utleniania, tym większa średnica włókien. Średnicę nanowłókien PANI można również kontrolować, stosując odpowiednie stężenie aniliny w syntezie [214,215]. Zależnie od pH elektrolitu podstawowego oraz wielkości przyłożonego potencjału, polianilina może występować w trzech formach redoks. Są to: leukoemeraldyna (stan całkowicie zredukowany), emeraldyna (stan częściowo utleniony) oraz pernigranilina (stan całkowicie utleniony) [216]. Na rysunku 16 przedstawiłem typowe dla polianiliny woltamperogramy w środowisku kwaśnym. Leukoemeraldyna, czyli całkowicie zredukowana oraz nieprzewodząca forma polianiliny, zbudowana jest z jednostek benzenoidowych. Częściowe utlenienie leukoemeraldyny prowadzi do otrzymania emeraldyny. Emeraldyna – z powodu obecności wolnych par elektronowych na atomach azotu – ma charakter zasadowy oraz nadal posiada własności izolacyjne ( $\sigma < 10^{-10} \text{ S cm}^{-1}$ ). Dopiero protonowanie oraz



domieszkowanie emeraldyny przeciwjonami prowadzi do znacznego zwiększenia jej przewodnictwa właściwego. Przewodnictwo sprotonowanej emeraldyny jest zbliżone do przewodnictwa metali ( $\sigma 10^{-1} - 10^2 \text{ S cm}^{-1}$ ) [217-219]. Dalsze utlenianie emeraldyny prowadzi do powstania kolejnej formy nieprzewodzącej, pernigraniliny.



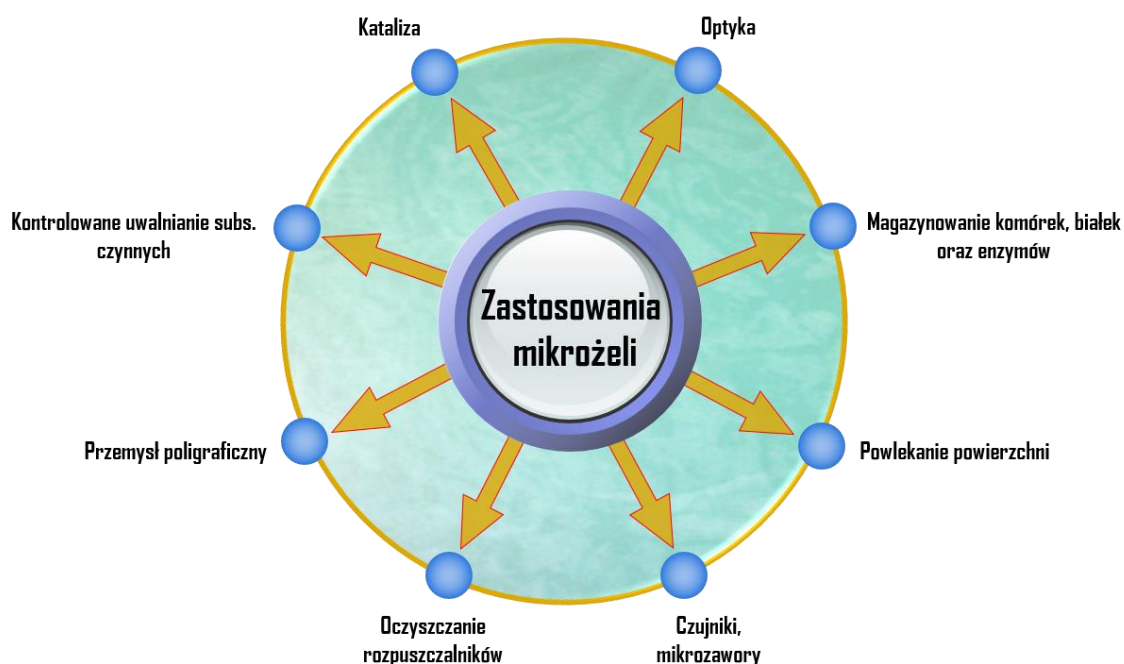
**Rysunek 16.** Woltamperometryczne przekształcanie polianiliny w różne jej formy w środowisku kwaśnym.



## 5. Zastosowania mikrożeli

Mikrożele jako inteligentne materiały – z powodu małych rozmiarów i z powodu szybkiego ulegania odwracalnemu objętościowemu przejściu fazowemu w odpowiedzi na zewnętrzne bodźce – cieszą się dużym zainteresowaniem i posiadają szeroki zakres zastosowań. Stosując różnego rodzaju monomery, zmieniając inicjatory, gęstość usieciowania [97,121,220], rozmiar cząstek i ich ładunek powierzchniowy [221] oraz używając różnego rodzaju rozpuszczalników lub ich mieszanin w czasie syntezy [64,222], można zmieniać właściwości mikrożeli i tym samym dostosować je do konkretnego celu.

Mikrożele używane są do powlekania powierzchni [223,224], do poprawy właściwości reologicznych farb [225], oraz używane są jako matryca do syntezy nanocząstek nieorganicznych [226-229]. Mikrożele znajdują także zastosowanie w magazynowaniu białek [230], komórek [231] i enzymów [149,232,233]. Znalazły również zastosowanie w poligrafii [234], w technikach rozdzielania [235-237] a nawet w odzyskiwaniu ropy naftowej [238]. Istnieje możliwość użycia mikrożeli w konstrukcji środowiskowo-czułych urządzeń optoelektronicznych [99,147] oraz różnego rodzaju czujników [239-242]. Mikrożele używane są także do wytwarzania kryształów fotonicznych [208,243,244]. W literaturze coraz częściej czytamy o możliwości użycia mikrożeli do magazynowania a następnie uwalniania różnych związków [240,245]. Struktura, nawodnienie oraz właściwości mechaniczne wielu syntetycznych mikrożeli podobne są do naturalnych tkanek. Hydrożele – ze względu na ich biokompatybilność oraz łatwą kontrolę ich właściwości – używane są w inżynierii tkankowej, w systemach dostarczania leków [246-248], do konstrukcji biosensorów oraz w innych obszarach biomedycyny [249-252]. Możliwe jest także zastosowanie termo-czułych mikrożeli, posiadających anionowe albo kationowe grupy powierzchniowe, do usuwania zanieczyszczeń jonowych ze ścieków. Natomiast mikrożele o zwiększonej hydrofilowości mogą być użyte jako przeciwpoporostowe powłoki powierzchniowe, stosowane w uzdatnianiu wody [253]. Możliwe zastosowania mikrożeli przedstawiłem na rysunku 17.



**Rysunek 17.** Zastosowania mikrożeli.

Dużym zainteresowaniem cieszą się syntezy nanocząstek przy użyciu matryc/reaktorów. Dotychczas jako matryce używano dendrymery [254,255], micelle złożone z kopolimerowych bloków [256] oraz wielowarstwowe polielektrolity [257,258]. Mikrozele ze względu na ich łatwą syntezę, funkcjonalizację oraz mały rozmiar, porównywalny z długością fali światła widzialnego, stanowią idealne mikroreaktory do tworzenia nanocząstek. Zhang i współpracownicy otrzymali mikrożel poli(*N*-izopropylakryloamid-kwas akrylowy-akrylan 2-hydroksyetylu) – p(NIPA-AA-HEA) o średnicy hydrodynamicznej od 200 – 600 nm, który posłużył jako matryca do syntezy nanocząstek półprzewodnika, metalu oraz nanocząstek magnetycznych [207]. Autorzy tak zoptymalizowali warunki reakcji oraz skład mikrożeli, aby po otrzymaniu nanocząstek w mikrożelu ich właściwości optyczne zostały zachowane.

Łączenie ze sobą mikrożeli z nanocząstkami nieorganicznymi prowadzi do stworzenia materiałów inteligentnych, posiadających właściwości typowe dla obydwu komponentów. Takie hybrydowe mikrozele, zawierające nanocząstki nieorganiczne, znajdują zastosowanie jako budulec kryształów fotonicznych. Kumacheva i współpracownicy pokryli mikrozele p(NIPA-AA-HEA) gęstą hydrofobową powłoką,

zbudowaną z kopolimeru metakrylanu metylu, akrylanu butylu oraz kwasu akrylowego (MMA-BA-AA) [208]. W rdzeniach hybrydowych cząstek umieszczono nanocząstki CdS i Ag, które ulegały samoorganizacji i tworzyły kryształy koloidalne. Lyon i współpracownicy otrzymali [259] kryształy koloidalne, które powstały przez samoorganizację termo-czułych mikrożeli p(NIPA-AA). Barwa otrzymanych obiektów w odróżnieniu od barwy wcześniej omawianych kryształów mogła ulegać zmianie. Mikrozele po odwirowaniu organizowały się w gęsto upakowane krystaliczne układy, wykazujące zjawisko opalizacji. Odbicie braggowskie, padającego na kryształ koloidalny promieniowania, zależało od temperatury. Mikrozele ulegały odwracalnej przemianie fazowej w temperaturze VPTT ok. 32°C, przechodząc ze stanu spęcniałego, uporządkowanego w stan skurczony, nieuporządkowany. W temperaturze pokojowej mikrożel, będąc w stanie uporządkowanym, charakteryzował się ostrym braggowskim pikiem dyfrakcyjnym, natomiast powyżej 32°C mikrożel był jedynie nieuporządkowaną mętną cieczą. Po ochłodzeniu mikrożel powracał do wcześniejszego stanu, jego struktura ulegała reorganizacji, natomiast stopień organizacji kryształów mikrożelu był taki sam, lub większy niż stopień organizacji kryształów w ich początkowym stanie. Niezwykła zdolność koloidalnych kryształów do reorganizacji czyni je trwałymi fizycznie oraz chemicznie.

Mikrozele znalazły także zastosowanie w tworzeniu mikrometrowych układów optycznych z możliwością zmiany długości ogniskowej. Lyon i współpracownicy [260] otrzymali układ soczewek poprzez przyłączenie mikrożelu p(NIPA-AA) do szklanego podłoża zmodyfikowanego 3-aminopropylotrimetoksylanem za pomocą oddziaływań elektrostatycznych. W pH = 6.5 siły przyciągania elektrostatycznego, pomiędzy zjonizowanymi grupami karboksylowymi mikrożelu oraz grupami aminowymi 3-aminopropylotrimetoksylanu, doprowadziły do związania się cząstek mikrożelu z podłożem. Lyon i współpracownicy [209] otrzymali również układy mikrosoczewek foto-przełączalnych. Układy te otrzymano poprzez osadzenie mikrożelu p(NIPA-AA) na powierzchni pokrytej nanocząstkami złota. Długość ogniskowa układu mikrosoczewek zależała od mocy światła laserowego, którym były napromieniowane próbki, oraz od takich warunków środowiska, jak temperatura i pH. Zaobserwowano, że układy mikrosoczewek wykazują zwiększoną zdolność ogniskowania, gdy wzbudzenie

nanocząstek Au, wywołane światłem laserowym, powodowało ogrzanie mikrożelu p(NIPA-AA) do temperatury powyżej temperatury VPTT.

## 5.1. Mikrożele jako nośniki leków

Czułe na temperaturę polimery, takie jak polimery pNIPA, ze względu na możliwość zmiany swojej konformacji z hydrofilowej (coil) w hydrofobową (globule), mogą w różnej postaci (tj. jako kapsułki, micelle oraz hydrożele) zostać użyte jako termo-czuły nośnik leku.

Idealny nośnik leków powinien spełniać szereg kryteriów. Częstki nośnika powinny mieć odpowiedni, jednakowy rozmiar. Od tego bowiem zależy rozmieszczenie cząstek nośnika w organizmie ludzkim oraz ich oddziaływanie z komórkami. Ponadto jedynie dla cząstek o zbliżonych rozmiarach można uzyskać podobną kinetykę uwalniania leku. Dodatkowo, w takich zastosowaniach, jak dostarczanie leków lub DNA przez barierę krew-mózg lub błonę komórkową, rozmiar cząstek powinien być mniejszy niż 200 nm. Ogólnie pożądane są cząstki o rozmiarach w zakresie 10 – 200 nm. Jeśli rozmiar cząstek jest większy niż 200 nm, należy je zmodyfikować hydrofilowymi oraz biokompatybilnymi środkami i ewentualnie sfunkcjonalizować, aby zapewnić ich krążenie w krwiobiegu przez dłuższy okres czasu i uniemożliwić ich zniszczenie w organach. Lek musi być nie tylko chroniony przed degradacją biologiczną, ale także powinien być transportowany do docelowego organu bez jakiegokolwiek jego utraty (byłby wówczas toksyczny dla zdrowych tkanek). Następnie powinien być uwolniony przez specyficzny zewnętrzny lub wewnętrzny bodziec, z możliwością kontroli tego uwalniania. Uwalnianie, zależnie od postawionego celu, może być natychmiastowe albo powolne i ciągle ze stałą szybkością. Nośniki muszą być stabilne, aby ilościowo dotrzeć do celu; zwykle muszą wytrzymać długi czas pobytu w krwiobiegu. Dyspersyjność oraz stabilność nośnika nie powinna się zmieniać pod wpływem zmian pH, siły jonowej oraz temperatury. Nośniki leków muszą mieć niską toksyczność. Ogólnie, każdy nośnik leku może spotkać na swej drodze różne przeszkody, np. może zostać rozpoznany przez układ fagocytarny (RES), zlokalizowany w wątrobie, śledzionie i płucach.

Obecnie nie ma jeszcze idealnego nośnika leku. Wiele uwagi poświęca się tworzeniu coraz bardziej zaawansowanych systemów dostarczających leki. Ograniczę się tutaj tylko do nośników polimerowych. Stosuje się m.in. dołączanie syntetycznych łańcuchów polimerowych do leku. Układ polimer-lek ma więcej zalet niż lek w stanie wolnym [261-263]. Zbyt małe rozmiary polimerów (6 – 15 nm) uniemożliwiają dożylne ich podanie, ponieważ tak małe cząstki z łatwością ulegają rozpoznaniu i zniszczeniu przez układ fagocytarny (RES) [264]. W roli nośnika leku lepsze niż polimery są usieciowane polimery, czyli hydrożele [265]. Nanometrowe hydrożele posiadają kilka zalet, dających im przewagę nad innymi rodzajami nanonośnikami. Mikrożele, składające się z połączonych ze sobą hydrofilowych łańcuchów polimerowych, podobnie jak dendrymery, posiadają wiele wolnych przestrzeni. Natomiast usieciowanie nadaje hydrożelom trwałość, rzadko spotykaną w przypadku innych nośników. Rozmiary hydrożeli można w łatwy sposób kontrolować i można tak dopasować ich rozmiar, aby nie doprowadzić do ich zniszczenia przez RES i, tym samym, przedłużyć czas obiegu hydrożeli w krwiobiegu. W sieci polimerowej hydrożeli można magazynować różnego rodzaju związki, w tym różne terapeutyki. Hydrożele mogą magazynować w swoim wnętrzu większą ilość danego związku niż nieusieciowane łańcuchy polimerowe.

Różnego rodzaju cząsteczki, o różnych rozmiarach, włączając leki, mogą dyfundować w głąb (magazynowanie leku) oraz z (uwalnianie leku) mikrohydrożeli. Dzięki dużej powierzchni właściwej mikrożeli, szybkiej odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, możliwości funkcjonalizacji i kontrolowania ich rozmiarów oraz dzięki możliwości magazynowania biomolekuł we wnętrzu sieci, kowalencyjnie usieciowane termo-czułe hydrożele są często badaną klasą środowiskowo-czułych materiałów do konstrukcji nośników leków [75,266]. Mikrożele stały się niezawodnym zbiornikiem/rezerwuarem do magazynowania leków.

Użycie monomerów amfifilowych podczas polimeryzacji pozwala na otrzymanie hydrożeli zawierających miejsca hydrofobowe. Hydrożele takie nadają się do przenoszenia leków hydrofobowych. Możliwa jest zarówno modyfikacja wewnętrznej sieci polimerowej hydrożeli, jak i ich powierzchni. Mikrożele można ukierunkować w określone miejsca organizmu poprzez ich biofunkcjonalizację. Można np. do powierzchni mikrożeli przyłączać różne receptory lub białka specyficzne, które

umożliwią mikrożelowi dotarcie do pożądanego miejsca. W ten sposób mogą one zostać użyte do leczenia specyficznych chorób i konkretnych komórek nowotworowych. Za pomocą funkcjonalizacji mikrożeli można także dopasować temperaturę przejścia fazowego do temperatury użytecznej biologicznie, tj. temperatury ludzkiego ciała lub temperatury stosowanej w hipertermii. Ogólnie, celem jest ukierunkowanie nośników do chorych tkanek i tam uwolnienie farmaceutyków, nie doprowadzając po drodze do oddziaływań leku z innymi zdrowymi tkankami. Ponadto, nadając cząstkom mikro- i nanożelu odpowiednie rozmiary, możemy ułatwić im penetrowanie ścian komórek. Mikrozele mogą być dostarczane do organizmu przez skórę, dożylnie, domięśniowo, doustnie, wziewnie lub jako krople do oczu.

## 5.2. Magazynowanie oraz uwalnianie leków

Magazynowanie a następnie uwalnianie cząsteczek leków odpowiednio w oraz z hydrożeli można kontrolować, zmieniając odpowiednio rozmiar porów w mikrożelu, oraz rodzaj i siłę oddziaływań leku z łańcuchami polimerowymi hydrożeli. Kluczowymi czynnikami odpowiedzialnymi za rozmiary porów jest skład sieci polimerowej oraz gęstość usieciowania hydrożeli [51]. Wszystkie powyższe właściwości można uzyskać zmieniając odpowiednio warunki syntezy hydrożeli. Dlatego też w projektowaniu hydrożeli do kontrolowanego uwalniania leku, konieczne jest dopasowanie składu polimerowego oraz gęstości usieciowania hydrożeli do rozmiaru oraz składu chemicznego cząsteczek leku, który będzie użyty. W sferycznych cząstkach żeli o małej wielkości dyfuzja próbek/cząsteczek leku jest szybsza, a stężenie równowagowe leku zostaje osiągnięte po zadowalająco krótkim czasie.

Usieciowane hydrozele użyte jako nośniki leków muszą posiadać dużą czystość i, co za tym idzie, powinny być nietoksyczne. Głównym źródłem toksyczności hydrożeli są nieprzereagowane monomery, oligomery i inicjatory. Po otrzymaniu hydrożelu pewna ilość tych związków zostaje w nim uwięziona. Gdy związki te zostają uwalniane z żelu, sprawia to, że żel jako nośnik leku staje się toksyczny [58]. Istnieje kilka sposobów na rozwiązanie tego problemu, na przykład: wydłużenie procesu polimeryzacji prowadzi do zwiększenia stopnia przereagowania substratów. Stosuje się również długoterminową dializę mikrożeli po ich syntezie lub ich odwirowywanie a następnie



redyspersję. Inicjatory, które są głównym źródłem toksyczności, można wyeliminować w syntezie poprzez inicjowanie jej za pomocą promieniowania gamma [267,268]. Do oceny toksyczności hydrożeli stosuje się testy cytotoksyczności z użyciem odpowiednich komórek.

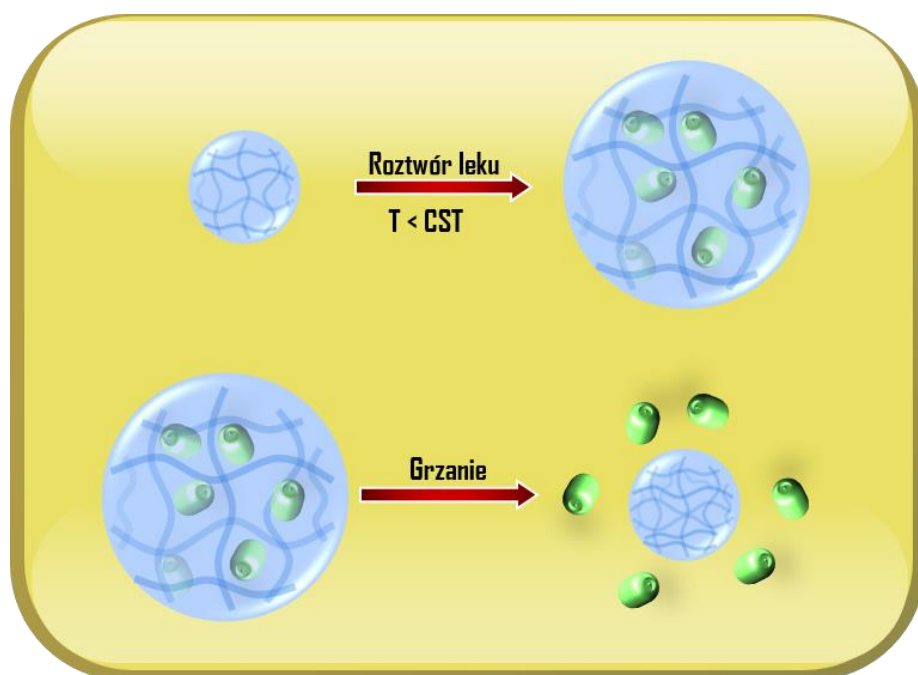
### **5.2.1. Magazynowanie leków w mikrożelach**

Istnieje stosunkowo niewiele, zgodnych z wymaganiami (jakie muszą spełniać nośniki dostarczające leki) technik umieszczania leku w hydrożelach. Pierwsza metoda polega na zmieszaniu przed syntezą odpowiednich ilości leku, monomeru/ów oraz czynnika sieciującego. Dodanie inicjatora zapoczątkowuje reakcję polimeryzacji, podczas której cząsteczki leku zostają pułapkowane wewnątrz powstającej sieci polimerowej [269]. Druga metoda polega na zmieszaniu leku z wcześniej otrzymanym polimerem a następnie usieciowaniu układu [270]. Wadą obydwu wyżej opisanych technik są możliwe reakcje uboczne, które mogą prowadzić do denaturacji leku/białka. Trzecia metoda, najczęściej używana, polega na poddaniu otrzymanego wcześniej, oczyszczonego i wysuszonego mikrożelu procesowi pęcznienia w roztworze zawierającym lek. Istotnym ograniczeniem tej metody są problemy z umieszczaniem w sieci polimerowej dużych cząsteczek, takich jak cząsteczki białka. Ilość zmagazynowanych w sieci polimerowej hydrożelu dużych cząsteczek, poprzez ich sorpcję z roztworu, jest często mniejsza niż 0.1% wag [271]. Ograniczenia te są związane z efektami sterycznymi. Mikrozele oczyszcza się z nadmiaru leku poprzez ich kilkakrotne odwirowywanie i zdyspergowanie w czystym rozpuszczalniku. Można również zastosować dializę. Mikrożel zawierający lek barwny zawsze różni się wizualnie od mikrożelu czystego. W systemach dostarczania leków używa się zarówno wysuszone jak i uwodnione, spęczniałe hydrozele, zawierające lek [272].

### **5.2.2. Uwalnianie leków z mikrożeli**

Najprostszym sposobem uwalniania leku z żeli jest doprowadzenie do skurczenia się żelu. Jeżeli jest to żel termo-kurczliwy i cząstki żelu nie są specyficznie związane z łańcuchami polimeru, to wraz ze skurczeniem żelu nastąpi wydalenie wody i cząsteczek leku w niej rozpuszczonych. Przedstawione jest to na rysunku 18, gdzie

magazynowanie oraz uwalnianie substancji – odpowiednio w, lub z termo-czułych mikrożeli na bazie pNIPA – kontrolowane jest za pomocą zmiany temperatury. Nagły wzrost temperatury, powyżej temperatury przejścia fazowego, tych mikrożeli skutkuje szybkim uwolnieniem leku z wnętrza mikrożelu do środowiska, w którym się on znajduje [273].



**Rysunek 18.** Schematyczne przedstawienie magazynowania oraz uwalniania substancji odpowiednio w oraz z czułych na temperaturę prostych mikrożeli PNIPA.

Innym sposobem na uwolnienie leku z mikrożeli jest zmiana pH lub potencjału redoks. Większość procesów fizjologicznych dąży do utrzymania homeostazy, czyli biologicznej i fizykochemicznej równowagi. Procesy chorobotwórcze zakłócają tę równowagę oraz prowadzą do zmiany temperatury, pH oraz potencjału redoks. Poza tym cytoplazma wykazuje w różnych częściach komórki różne stężenia jonów wodorowych. Dodatkowo pH zależne jest od typu komórki. Wiele procesów chorobotwórczych powoduje lokalny spadek pH [274,275]. Z niskim pH oprócz żołądka można spotkać się w tkankach nowotworowych oraz tkankach objętych procesem zapalnym. pH wewnątrzkomórkowe tkanek zdrowych i nowotworowych jest podobne, lecz nowotwory wykazują niższe endosomalne pH. Endosomalne pH może mieścić się nawet w zakresie 4.5 – 6.5 [276]. Ponadto stosowanie hipertermii w leczeniu nowotworów, czyli lokalnego poddawania tkanek nowotworowych działaniu

wysokich temperatur za pomocą zewnętrznego źródła ciepła – do 44°C [277], powoduje podniesienie temperatury guza i prowadzi do większego zakwaszenia komórek nowotworowych. Jednym z pierwszych zastosowań mikrożeli czułych na zmiany pH w biomedycynie było doustne dostarczanie zmagazynowanych w nich biomakromolekuł. Kwaśne, proteolityczne środowisko żołądka jest ogromną przeszkodą, jaką napotykają na swej drodze doustnie podane biologiczne makromolekuły. Mikrożele, czułe na zmiany pH, mogą kurczyć się w środowisku kwaśnym komórek nowotworowych i uwalniać zmagazynowaną w nich substancję czynną. Znane są mikrożele czułe na zmiany pH, które – pęczniejąc w środowisku kwaśnym – uwalniają zmagazynowany w nich lek do chorych tkanek, oraz takie, które kurcząc się w środowisku kwaśnym, uwalniają lek.

W sieci polimerowej mikrożeli zmodyfikowanych kwasem metakrylowym pKa grupy bocznej kwasu metakrylowego wynosi 4.5. Kiedy taki mikrożel znajdzie się w środowisku, jakie panuje w żołądku (pH 2 – 4), następuje protonowanie grup karboksylowych i sieć polimerowa kurczy się. Natomiast, gdy hydrożel przejdzie z żołądka do jelita cienkiego (pH 6 – 7), następuje zjonizowanie grup kwasowych i sieć polimerowa zacznie pęcznieć. Peppas oraz współpracownicy otrzymali mikrożel na bazie glikolu polietylenowego i poli(kwasu metakrylowego), który chronił zmagazynowane w nim cząsteczki leku przed degradacją żołądkową [278-280]. Zdolność mikrożelu do wiązania leku zależała od pH. W żołądku mikrożel był związany z cząsteczkami leku i chronił go przed kwaśnym pH. Uwalnianie leku możliwe było dopiero w środowisku o wyższym pH w jelicie cienkim [281]. Ponadto zaobserwowano zwiększoną absorpcję leku – insuliny z mikrożelu przez błonę śluzową. Wchłanianie leku przez błonę jelita zależała od rozmiaru cząstek mikrożelu. Dla mikrożeli o mniejszych rozmiarach (średnica < 43 µm) obserwowano znaczny wzrost wchłaniania insuliny w porównaniu z mikrożelami o dużych rozmiarach (średnica > 180 µm) [282]. Za pomocą polimeryzacji strąceniowej naukowcy otrzymali także nanożele p(MAA-PEG) [283-286]. Otrzymane nanożele również były zdolne do kapsułkowania insuliny oraz chroniły ją przed środowiskiem żołądka, jednak wchłanianie leku in vivo było dużo gorsze niż dla mikrożeli [287].

Langer i współpracownicy [288] oraz Frechet i współpracownicy [289] próbowali użyć submikronowe żele czułe na pH do uwalniania zmagazynowanego w nich leku i wprowadzenia ich do makrofagów (komórek tkanki łącznej) pod wpływem zmiany pH. Jednak cząstki mikrożeli były zbyt duże, aby dostać się w dużym stopniu do wnętrza komórek nowotworowych. Lyon i współpracownicy [290] rozwiązyli problem, otrzymując mikrożele pNIPA o rozmiarach ok. 270 nm i modyfikując je kwasem foliowym. Cytotoksyczność tych mikrożeli zależała od temperatury. W cytozolu w podwyższonej temperaturze cząstki mikrożeli agregowały wykazując zwiększoną cytotoksyczność. W innych próbach Soppimath i współpracownicy [291] otrzymali mikrożel pNIPA, zmodyfikowany dimetyloakryloamidem oraz kwasem undekanowym, który był stabilny w pH = 7.4 oraz w temperaturze 37°C, natomiast w środowisku kwaśnym uwalniał zmagazynowane w nim cząsteczki leku i agregował. Jednak cząstki mikrożelu nie były testowane na komórkach. Z kolei Das oraz Zhang otrzymali mikrożel oparty na chitozanie oraz mikrożel p(NIPA-AA), czuły na zmiany pH, które uwalniały zmagazynowany w nich lek do komórek nowotworowych HeLa [116,292]. Wywołane spadkiem pH kurczenie się mikrożelu p(NIPA-AA) prowadziło do uwalniania leku, natomiast indukowane wzrostem pH, do około 7, pęcznienie mikrożelu opartego na chitozanie prowadziło do uwalniania się leku na zasadzie dyfuzji.

Inne sposoby uwalniania leku z mikrożeli wykorzystują degradację sieci polimerowej. Degradacja sieci polimerowej może doprowadzić do jej całkowitego rozpadu na monomery. Możliwe jest to w przypadku, gdy sieć zbudowana jest z np. polisacharydów, polipeptydów, poliestrów lub polilaktydów. Degradacja sieci polimerowej może następować także w wyniku zerwania wiązań chemicznych w czynnikach sieciujących. Atrakcyjne są mikrożele czułe na reduktory i utleniacze, usieciowane za pomocą czynnika (cross-linker) zawierającego np. mostki disiarczkowe. Ten aspekt był jednym z kierunków moich badań. Odpowiednio sfunkcjonalizowane mikrożele, zawierające w sieci polimerowej mostki disiarczkowe, mogą ulegać degradacji (zrywanie mostków disiarczkowych) pod wpływem redukującego środowiska cytozolu. Czynnikiem redukującym w cytozolu komórek ludzkiego ciała jest glutation, znany przeciwutleniacz oraz reduktor disiarczków. To właśnie ze względu na obecność glutationu w komórkach większość białek wewnątrzkomórkowych jest wolna od wiązań disiarczkowych [293]. Wiadomo, że

komórki rakowe mają ok. 4 razy wyższe stężenie glutationu niż komórki zdrowe. W konsekwencji, Amiji oraz współpracownicy po otrzymaniu – żelatynowych nanocząstek usieciowanych cząsteczkami zawierającymi disiarczki – obserwowali redukcję mostków za pomocą glutationu i degradację nanocząstek oraz uwolnienie zmagazynowanego w nich leku [294-296]. Hubbel i współpracownicy [297,298] otrzymali nanonośniki czułe na utlenianie. Wiadomo, że w tkankach objętych stanem zapalnym występuje lokalny wzrost stężenia czynników utleniających. Dlatego nanonośniki czułe na utlenianie mogą uwalniać zmagazynowany w nich lek.

W literaturze można także przeczytać o mikrożelach hybrydowych z foto-termicznie indukowanym objętościowym przejściem fazowym, stosowanych jako nośniki dostarczające leki. Sieć polimerowa takich mikrożeli zmodyfikowana jest związkami chemicznymi czułymi na światło, takimi jak barwniki lub nanocząstki metali [140,299-302]. Napromieniowanie mikrożeli światłem o odpowiedniej długości fali prowadziło do ich foto-termicznego przejścia fazowego. Konwersja energii świetlnej na ciepło (relaksacja bezpromienista) powoduje ogrzanie mikrożeli i tym samym prowadzi do przejścia fazowego mikrożeli. W przypadku mikrożeli opartych na polimerach o dolnej krytycznej temperaturze rozpuszczalności – następuje skurczenie mikrożeli. Istotne jest, aby długość fali, przy której następuje wzbudzenie czułych na światło ugrupowań wprowadzonych do mikrożeli, znajdowała się w zakresie od 800 do 1200 nm, czyli w zakresie okna terapeutycznego, ponieważ światło o długości fali z tego zakresu może głęboko wnikać w tkanki ciała i tylko wtedy foto-termicznie czułe mikrozele mogą być użyte jako nośniki leku.



## 6. Aparatura i odczynniki

### 6.1. Aparatura

Do oczyszczania mikrożeli stosowałem dializę z odpowiednią błoną dializacyjną (Spectra/Por® 7 Dialysis Membrane, limit 10000 Da). Niektóre z otrzymanych mikrożeli odwirowałem przy użyciu wirówki Eppendorf Centrifuge 5430 R z rotorem FA-45-30-11. Przed pomiarami oczyszczoną zawiesinę mikrożeli przepuszczałem przez filtr strzykawkowy z włókna szklanego o wielkości porów od 1 do 2  $\mu\text{m}$ .

Średnicę hydrodynamiczną/stopień napężnienia mikrożeli mierzyłem techniką dynamicznego rozpraszania światła przy użyciu sprzętu Zetasizer firmy Malvern (Nano ZS, UK), zaopatrzonego w laser He-Ne o mocy 4 mW i długości fali 632.8 nm. Pomiary rozpraszania światła prowadziłem pod kątem  $173^\circ$ . Pomiary prowadziłem w jednorazowych kwadratowych celkach z polistyrenu. Przewodność elektryczną oraz potencjał Zeta mierzyłem również za pomocą sprzętu Zetasizer przy użyciu specjalnych U-kształtnych celek kapilarnych z elektrodami złotymi.

Pomiary konduktometryczne wykonywałem przy użyciu konduktometru firmy Radiometer, model CDM230. Stosowałem sondę konduktometryczną typu CDC241-9, która przeznaczona jest do pomiarów przewodnictwa właściwego poniżej  $20 \text{ mS cm}^{-1}$ .

Badania morfologii otrzymanych mikrożeli prowadziłem przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego: SEM – model LEO 435 VP (Zeiss, Niemcy), współpracującego z analizatorem EDS Röntec, model M1, oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego: TEM – model Libra 120 (Zeiss, Niemcy) o napięciu przyspieszającym 120 kV.

Mikroskop SEM był wyposażony w detektory elektronów wtórnych (SE), elektronów elastycznie odbitych (BSE) oraz detektory promieniowania rentgenowskiego (EDS). Podczas wykonywania zdjęć mikrożeli korzystałem z detektora elektronów elastycznie rozproszonych z filtrem energii oraz wewnątrz soczewkowego detektora elektronów wtórnych (In-Lens). Detektory te odpowiedzialne

były za uzyskanie obrazów o najwyższej z możliwych rozdzielczości. Podczas pomiarów napięcie przyspieszające wiązkę elektronów wynosiło 3 kV. Tuż przed pomiarem SEM napylałem na próbki cienką warstwę (ok. 5 nm) stopu Au-Pd przy użyciu napylarki Polaron SC7620 Mini Sputter Coater, aby próbka się nie elektryzowała. Próbki do pomiarów TEM przygotowywałem poprzez nakropienie wodnej dyspersji cząstek mikrożelu na miedziane siatki pokryte formvarem. Następnie próbki suszyłem w temperaturze pokojowej.

Pomiary elektrochemiczne wykonywałem w układzie trójelektrodowym. Elektroda pracującą była dyskowa elektroda złota o promieniu 3 mm, elektrodą odniesienia była elektroda Ag/AgCl, oraz elektrodą pomocniczą był drucik platynowy. Elektrode złotą czyściłem przed każdym pomiarem na materiale polerskim z proszkiem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  o rozmiarach 0.3  $\mu\text{m}$ . Po każdym polerowaniu elektrodę przepłukiwałem strumieniem wody destylowanej w celu pozbycia się tlenku glinu z jej powierzchni. Eksperymenty przeprowadziłem w ściśle określonych temperaturach. W przypadku pomiarów woltamperometrycznych elektrody były umieszczone w termostatowanym naczynku szklanym, przy użyciu termostatu Polyscience. Dokładność pomiaru temperatury wynosiła 0.2°C. W przypadku pomiarów z wykorzystaniem techniki DLS, przyrząd zmieniał temperaturę z dokładnością 0.1°C. Pozostałe eksperymenty wykonywałem w temperaturze otoczenia, która wynosiła średnio ok. 23°C.

Pomiary woltamperometryczne wykonywałem przy użyciu potencjostatu CH Instrument, model 700D. W celu redukcji szumów, związanych z zewnętrznymi polami elektrycznymi, wszystkie eksperymenty elektrochemiczne prowadziłem w puszcze Faradaya.

Pomiary wartości pH wykonywałem przy użyciu pH-/jono-metru firmy MeterLab, model PHM 240. Jako sondę stosowałem klasyczną kombinowaną elektrodę szklaną.

Pomiary transmitancji oraz absorbancji wykonywałem przy użyciu spektrofotometru UV-Vis, model Lambda 25, Perkin-Elmer, USA.



## 6.2. Odczynniki

Lista odczynników i ich charakterystyka umieszczone są w tabeli 2.

Odczynnik	Producent	Czystość	Funkcja
<i>N</i> -izopropylakryloamid (NIPA)	Aldrich	97%	Monomer podstawowy
<i>N,N'</i> -metylenobisakryloamid (BIS)	Aldrich	99%	Czynnik sieciujący
<i>N,N'</i> -bis(akryloilo)cystyna (BISS)	1		Czynnik sieciujący
<i>N</i> -δ-akryloiloorńityna (AcOrn)	1		Monomer modyfikujący
Anilina (An)	POCH	cz.d.a.	Monomer modyfikujący
Nitrobenzen (NB)	Aldrich	99%	Rozpuszczalnik aniliny
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloetylodiamina (TEMED)	Aldrich	99.5%	Akcelerator polimeryzacji wolnorodnikowej
Sól potasowa lub sodowa kwasu nadtlenodwusiarkowego (KPS lub SPS)	Aldrich	99.99%	Inicjatory polimeryzacji
Roztwory chlorku potasu 0.01 M i 0.001 M	Fluka	99.9%	Roztwór stosowany do kalibracji sondy konduktometrycznej
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	POCH	98%	Odczynnik używany do tworzenia kompleksów z mikrożelem
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Aldrich	99%	Odczynnik używany do tworzenia kompleksów z mikrożelem
DL-ditiotreitol (DTT) oraz zredukowany L-glutation (GSH)	Aldrich	98%	Czynnik redukujący mostki disiarczkowe
Chlorowodorek doksorubicyny (DOX)	Aldrich	99%	Lek przeciwnowotworowy umieszczany w mikrożelu
NaCl	POCH	cz.d.a.	Odczynnik używany do kontrolowania siły jonowej
$\text{CH}_3\text{COOH}$ , $\text{CH}_3\text{COONa}$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	POCH	cz.d.a.	Składniki roztworów buforowych
$\text{HCl}_{\text{aq}}$	Aldrich	Reagent ACS	Modyfikator pH
$\text{NaOH}_{\text{aq}}$	Aldrich	Reagent ACS	Modyfikator pH
$\text{HClO}_4$	Aldrich	99.99%	Elektrolit podstawowy
Benzen	POCH	cz.d.a.	Składnik mieszaniny do oczyszczanie monomeru NIPA
Heksan	POCH	cz.d.a.	Składnik mieszaniny do oczyszczanie monomeru NIPA

1 - związek syntezowany przez J. Romańskiego, Uniwersytet Warszawski

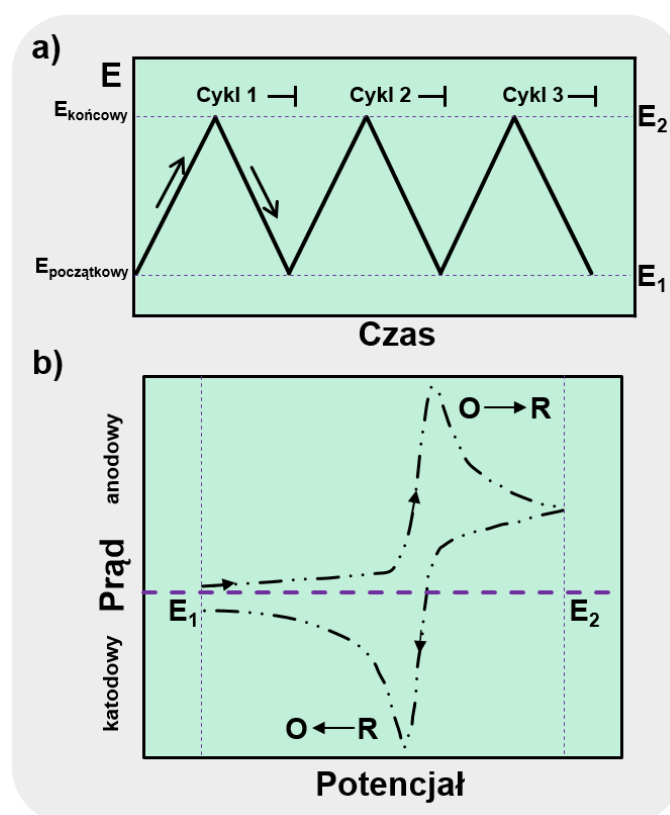
**Tabela 2.** Stosowane odczynniki oraz ich charakterystyka.

Do wszystkich eksperymentów używałem wody demineralizowanej za pomocą systemu Milli-Q Plus/Millipore; przewodnictwo właściwe wody  $0.055 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Wszystkie substancje chemiczne użyłem w takim stanie, w jakim je zakupiłem, bez wstępnych przygotowań, z wyjątkiem głównego budulca sieci polimerowej mikrożeli, monomeru NIPA, który przed użyciem dwukrotnie rekrytalizowałem z mieszaniny benzen/heksan (9:1) w celu usunięcia zanieczyszczeń oraz substancji inhibitujących polimeryzację wolnorodnikową, które były celowo dodane przez producenta.

## 7. Techniki badawcze

### 7.1. Woltamperometria cykliczna

Metoda woltamperometrii cyklicznej (Cyclic Voltammetry – CV) służy do pomiaru zależności pomiędzy natężeniem prądu płynącego przez elektrodę pracującą a jej potencjałem. Potencjał zmieniany jest liniowo (patrz rysunek 19a). Elektroda wskaźnikowa może być wykonana z takich materiałów, jak: złoto, węgiel szklisty, platyna oraz rtęć. Powierzchnia elektrody pracującej podczas pomiarów nie ulega zmianie.



**Rysunek 19.** Zmiany potencjału elektrody w czasie w woltamperometrii cyklicznej (a), przykładowa jednocykliczna krzywa (b).

Dla procesów odwracalnych podczas zwiększania potencjału od wartości  $E_1$  do wartości  $E_2$ , dla elektrod o konwencjonalnych rozmiarach, otrzymujemy pik anodowy. Po odwróceniu kierunku zmian potencjału produkt reakcji anodowej ulega redukcji i na krzywej  $I = f(E)$  pojawia się pik redukcji.

Wzór na prąd mierzony techniką CV, w temperaturze 25°C, przy użyciu elektrody o konwencjonalnych rozmiarach opisuje równanie Randlesa – Sevcika:

$$I_p = 2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} \nu^{\frac{1}{2}} C \quad 35$$

gdzie:  $n$  – liczba elektronów biorąca udział w procesie elektrodowym,  $A$  – powierzchnia elektrody [ $\text{cm}^2$ ],  $D$  – współczynnik dyfuzji substancji elektroaktywnej [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ],  $\nu$  – szybkość polaryzacji elektrody [ $\text{V s}^{-1}$ ], a  $C$  – stężenie substancji elektroaktywnej w głębi roztworu [ $\text{mol cm}^{-3}$ ].

Woltamperometria cykliczna jest szczególnie użyteczna w wyznaczaniu potencjałów redoks różnych układów. Na podstawie położenia maksimum natężenia prądu można wyznaczyć standardowy potencjał redoks i zidentyfikować obecną w roztworze substancję. Natomiast kształt woltamperogramu może dostarczyć informacji na temat kinetyki procesu elektrodowego [303].

## 7.2. Dynamiczne rozpraszanie światła i potencjał Zeta

Dynamiczne rozpraszanie światła (Dynamic Light Scattering – DLS) jest metodą, używaną do analizy średnich średnic hydrodynamicznych cząstek oraz wyznaczenia ich rozkładu wielkości. Średnica hydrodynamiczna mierzona techniką dynamicznego rozpraszania światła określana jest jako „średnica hipotetycznej kuli sztywnej, która dyfunduje w taki sam sposób, jak mierzona cząstka”. W praktyce duże cząstki zawieszone w roztworach nie są kuliste, przemieszczają się i są solwatowane. W związku z tym średnica wyliczona metodą DLS będzie uśrednioną, rzeczywistą wartością dla solwatowanej cząstki. Za pomocą tej metody można również zmierzyć takie parametry, jak: stałe szybkości reakcji chemicznych, współczynniki aktywności oraz współczynniki dyfuzji [304]. Dynamiczne rozpraszanie światła jest metodą dobrze działającą w rozcieńczonym roztworze. W metodzie DLS w celu wyznaczenia rozmiaru cząstek mierzone są fluktuacje fotonów rozproszonych przez cząstki badanej próbki. Szybkość fluktuacji natężenia światła rozproszonego zależy od dyfuzji cząsteczek. W pobliżu ruchomych cząstek znajduje się ekran, na który pada światło rozproszone i tworzy jarzący się obraz. Zakłada się, że cząstki mają kształt sferyczny i podlegają

przypadkowym ruchom Browna. Duże cząstki poruszają się wolno a małe szybko; ma to wpływ na jarzący się obraz. Cyfrowy korelator mierzy stopień podobieństwa między dwoma sygnałami w określonym przedziale czasu. Porównuje się sygnał natężenia dla określonego fragmentu jarzącego się obrazu w różnym czasie. Rejestrowane fluktuacje natężenia światła analizowane są za pomocą funkcji autokorelacyjnej [305]. Znormalizowana funkcja autokorelacyjna, opisująca zmiany intensywności rozpraszanego światła w czasie, dana jest wzorem [306]:

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad 36$$

gdzie:  $I$  jest intensywnością rozpraszanego światła a nawiasy kątowne oznaczają średni czas.

Porównywana jest intensywność  $I(t)$  w czasie  $t$ , z intensywnością  $I(t+\tau)$  po niewielkim upływie czasu  $(t+\tau)$ . Funkcja autokorelacyjna zanika szybciej dla małych cząstek niż dla dużych. Dla monodispersyjnej próbki funkcja autokorelacyjna zanika eksponencjalnie:

$$g(\tau) = 1 + \beta \exp(-2\Gamma\tau) \quad 37$$

gdzie:  $\Gamma$  to szybkość zaniku (odwrotność czasu korelacji) a  $\beta$  jest współczynnikiem korekcji, który zależy od kształtu i ustawień wiązki lasera.  $\Gamma$  opisuje wzór:

$$\Gamma = q^2 D \quad 38$$

gdzie:  $D$  to współczynnik dyfuzji, natomiast wektor  $q$  opisujący falę rozpraszanego światła dany jest wzorem:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad 39$$

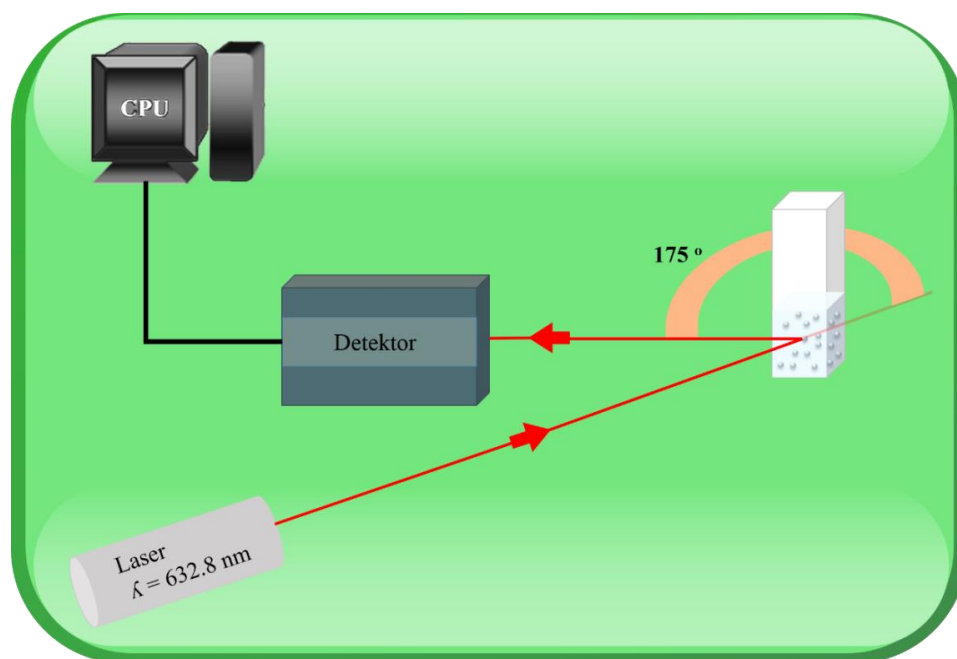
gdzie:  $\lambda$  to długość fali światła laserowego,  $n$  to współczynnik załamania światła przez badaną próbkę oraz  $\theta$  to kąt rozpraszania, czyli kąt, pod jakim umieszczony jest detektor względem celki z badaną próbką.

Znając współczynnik dyfuzji (szybkość ruchów Browna) i stosując przekształcenie równania Stokes-Einstein'a można obliczyć średnicę hydrodynamiczną  $D_h$ :

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad 40$$

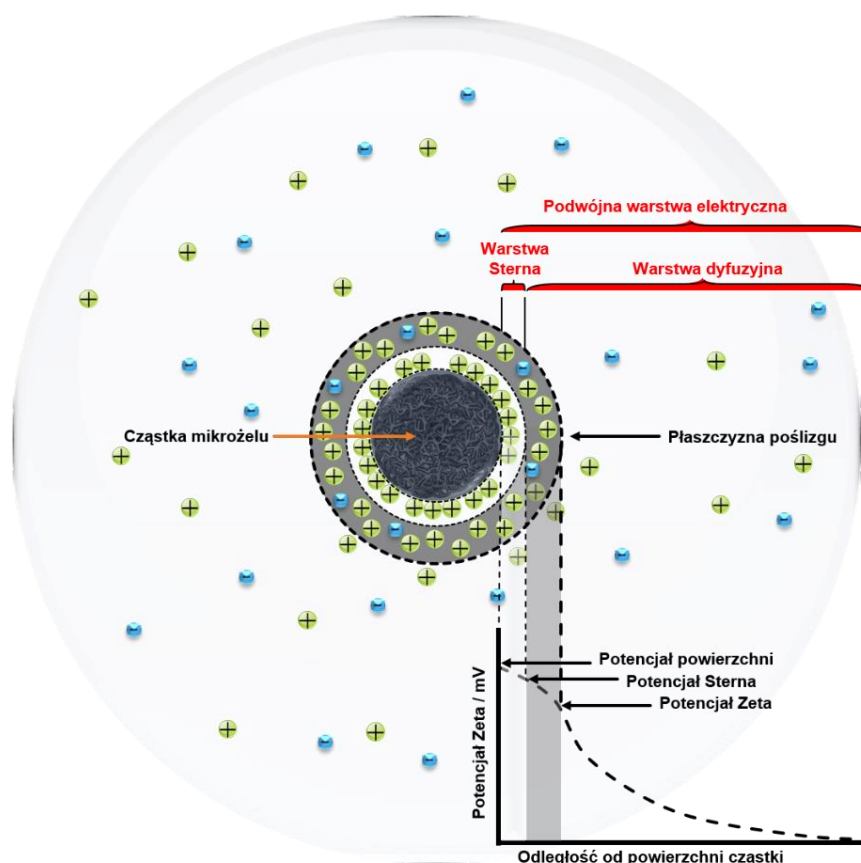
gdzie:  $k$  – stała Boltzmanna,  $T$  – temperatura oraz  $\eta$  – lepkość rozpuszczalnika.

W spektrometrii DLS opartej na dynamicznym rozpraszaniu światła, zwanej też spektroskopią z korelacją fotonową (Photon Correlation Spectroscopy – PCS), mierzy się natężenie światła rozpraszanego pod kątem prawie  $180^\circ$ . Jest to rozpraszanie wsteczne, które działa w oparciu o technikę zwaną NIBS (Non-Invasive Back-Scatter – nieinwazyjne rozpraszanie wsteczne). Dzięki temu padająca wiązka światła nie musi przechodzić przez całą próbkę i można wyeliminować efekt tzw. wielokrotnego rozpraszania (patrz rysunek 20). Rozpraszanie wsteczne pozwala na pomiar próbek o większych stężeniach. Można zredukować rozpraszanie światła przez większe cząstki niż cząstki próbki, na przykład cząstki kurzu lub inne zanieczyszczenia, które rozpraszają światło do przodu (promieniowanie poruszające się w kierunku odchylonym od pierwotnego o kąt mniejszy niż  $90^\circ$ ).



**Rysunek 20.** Schemat przedstawiający zasadę działania spektrometru DLS (dynamiczne rozpraszanie światła).

Za pomocą spektrometru DLS możliwy jest także pomiar potencjału elektrokinetycznego, tzw. potencjału Zeta ( $\zeta$ ). Istnienie potencjału  $\zeta$  jest przyczyną występowania zjawisk elektrokinetycznych. Potencjał Zeta (ang.  $\zeta$ -potential) jest to potencjał, który powstaje na granicy zwanej płaszczyzną poślizgu. Płaszczyzna ta występuje między warstwą Sterna, która jest warstwą cieczy otaczającą cząstkę, w której jony przeciwne są ściśle związane z cząstką, a warstwą dyfuzyjną, w której jony są słabiej związane z cząstką (patrz rysunek 21). Wewnątrz płaszczyzny poślizgu jony i cząstka tworzą stabilną całość. Podczas ruchu cząstki jony w obrębie płaszczyzny poślizgu poruszają się wraz z nią, natomiast jony spoza granicy – nie. Potencjał Zeta wyznacza się wykorzystując pomiar prędkości cząstek w polu elektrycznym z zastosowaniem efektu Dopplera.



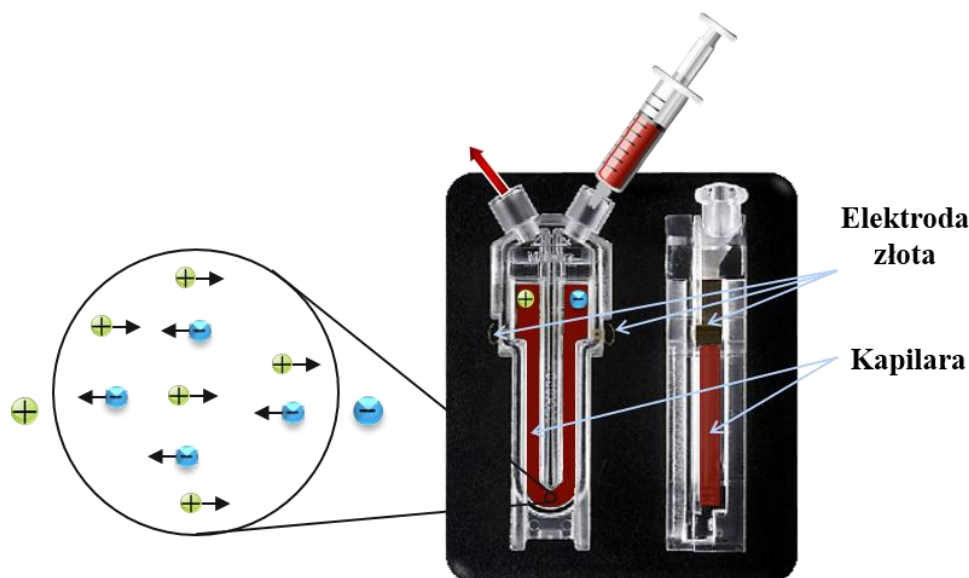
**Rysunek 21.** Rozmieszczenie jonów w podwójnej warstwie elektrycznej otaczającej cząstkę mikrożelu w roztworze oraz przedstawienie płaszczyzn występujących w roztworze, istotnych w pomiarach potencjału Zeta.

Za pomocą wielkości potencjału Zeta można określić stabilność cząstek koloidalnych. Ze stabilną zawiesiną koloidalną mamy do czynienia wtedy, kiedy cząstki



koloidalne są dobrze zdyspergowane w danym ośrodku. Jeżeli cząstki w zawiesinie mają duży ujemny albo dodatni potencjał Zeta, to nie będą flokulować. Natomiast cząstki o niskim potencjale Zeta będą miały skłonność do flokulacji, ponieważ nie będzie siły, która przeszkadzałaby cząstkom zbliżać się do siebie.

Spektrometry DLS, na przykład analizator Zetasizer Nano, obliczają potencjał Zeta z równania Henry'ego mierząc ruchliwość elektroforetyczną. Ruchliwość elektroforetyczna cząstek w badanej próbce otrzymywana jest z prędkości cząstek. Prędkość cząstek mierzona jest za pomocą lasera z wykorzystaniem zjawiska Doppler'a. Pomiar wykonywany jest przy użyciu celki z dwoma elektrodami złotymi (patrz rysunek 22), do których przykładane jest napięcie i mierzona jest ruchliwość cząstek, poruszających się w elektrolicie w stronę elektrody o przeciwnym ładunku.



**Rysunek 22.** Zdjęcia przedstawiające z dwóch stron U-kształtną celkę kapilarną do pomiaru potencjału Zeta. Cząstki poruszają się w stronę elektrody o przeciwnym ładunku i mierzona jest ich prędkość/ruchliwość.

Znając prędkość cząstki w polu elektrycznym, czyli jej ruchliwość elektroforetyczną, można przy użyciu równania Henry'ego otrzymać potencjał Zeta. Równanie Henry'ego wygląda następująco:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad 41$$

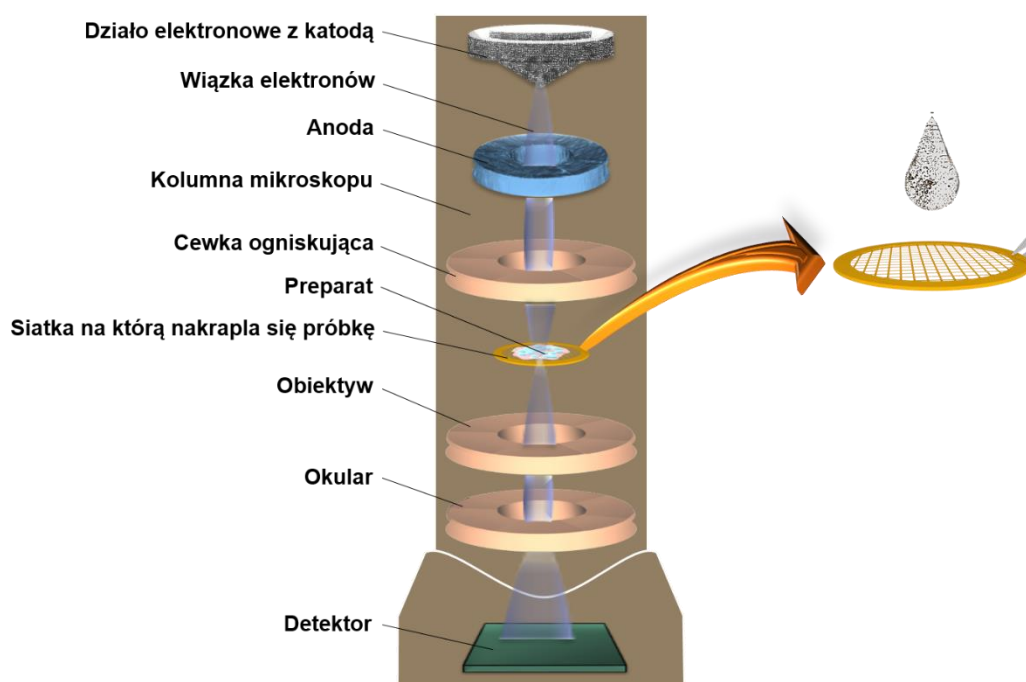


gdzie:  $z$  – to potencjał Zeta,  $U_E$  – ruchliwość elektroforetyczna,  $\varepsilon$  – przenikalność dielektryczna,  $\eta$  – lepkość,  $f(Ka)$  – funkcja Henry’ego.

Dla cząstek większych niż  $0.2 \mu\text{m}$ , zdyspergowanych w roztworach wodnych o średnich stężeniach elektrolitu, funkcja  $f(Ka)$  wynosi 1.5 (przybliżenie Smoluchowskiego). Dla małych cząstek w ośrodkach o małej stałej dielektrycznej oraz zazwyczaj dla próbek niewodnych funkcja  $f(Ka)$  wynosi 1.0 (przybliżenie Huckel’a).

### 7.3. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) jest techniką używaną do badania morfologii mikro- i nano-materiałów na podstawie oddziaływań wiązki elektronów emitowanych z katody, z badaną próbką. Innym źródłem elektronów może być działo z emisją polową z wykorzystaniem wysokiego pola elektrycznego. Schemat mikroskopu TEM przedstawiłem na rysunku 23.



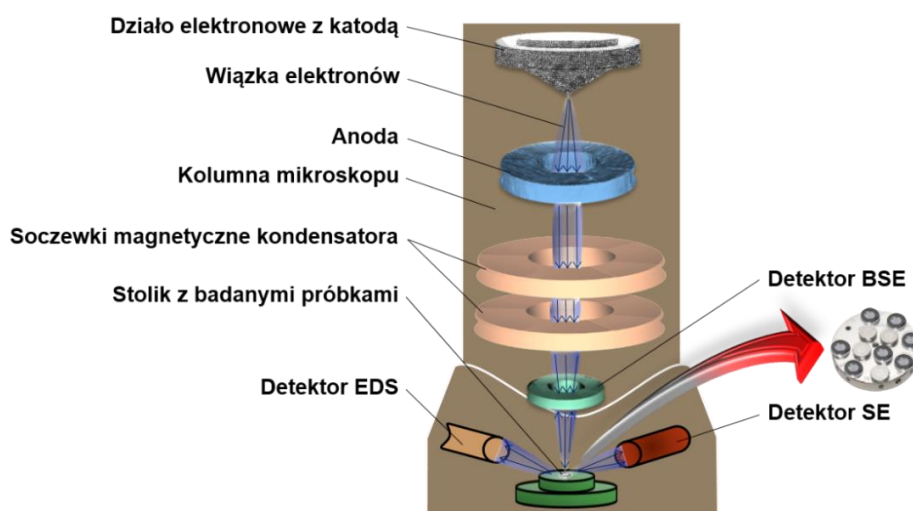
**Rysunek 23.** Uproszczony schemat transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).

Część wiązki padającej na próbkę zostaje ugięta, a część przez nią przenika. Pomiar odbywa się w wysokiej próżni, w celu zapewnienia warunków sprzyjających emisji elektronów. Katoda wykonana jest z drutu wolframowego rozgrzanego prądem do

temperatury powyżej 1000°C [307,308]. Poniżej katody znajduje się anoda. Pomiedzy katodą a anodą przyłożone jest wysokie napięcie przyspieszające elektrony (100 – 400 kV). Wiązka elektronów jest formowana przez soczewki elektromagnetyczne (soczewki kondensatora), dzięki czemu można kontrolować wielkość oświetlanego obszaru. Im większe napięcie przyspieszające, tym mniejsza długość fali i lepsza uzyskiwana rozdzielczość. Wysokie napięcie przyspieszające powoduje, że część elektronów przenika przez próbkę, a następnie skupiana jest przez układ soczewek i przechodzi przez przesłonę oraz trafia na ekran fluorescencyjny. Wzrost napięcia przyspieszającego, i tym samym wzrost energii elektronów wiązki padającej, wiąże się ze wzrostem objętości oraz głębokości obszaru, z którego emitowane są sygnały [309].

## 7.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) jest techniką służącą do badania struktury powierzchni oraz topografii powierzchni materiałów przewodzących, a także pozwala na wyznaczenie składu pierwiastkowego badanych materiałów. W przypadku badania materiałów nieprzewodzących techniką SEM wymagane jest napylenie na próbkę materiału przewodzącego np. złota, co warunkuje wzrost trwałości próbki i pozwala na wielokrotne obrazowanie skanowanych powierzchni [310]. Schemat mikroskopu SEM przedstawiłem na rysunku 24.



**Rysunek 24.** Uproszczony schemat budowy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Badana próbka bombardowana jest wiązką elektronów o energii od 0.1 do 30 keV emitowanych z katody, które rozpędzane są pod wpływem napięcia przyspieszającego. Katoda wykonana jest z włókna wolframowego, heksaboru lantanu lub z działła z emisją polową (Field Emission Gun – FEG). Powyższe źródła elektronów dają różną jasność. Większa jasność oznacza mniejszą średnicę wiązki elektronów, większą czułość oraz większą rozdzielczość [307]. Użycie LaB<sub>6</sub>, (ogrzewanego do temperatury 1700 – 1900 K) skutkuje zmniejszeniem średnicy wiązki elektronów, a więc daje więcej jasności niż włókno wolframowe. LaB<sub>6</sub> ma dodatkowo dłuższy czas życia. Większą rozdzielczość można także uzyskać, stosując cienką katodę wolframową z emisją polową przy użyciu silnego pola elektrycznego. FEG emituje dużo węższą wiązkę elektronów w stosunku do innych źródeł i daje dużo większą jasność niż wolfram czy LaB<sub>6</sub>. Zarówno działło emisji polowej, jak i działło z LaB<sub>6</sub> wymaga stosowania wyższej próżni [311].

Typowe napięcie przyspieszające w mikroskopii skaningowej jest o wiele mniejsze niż w przypadku TEM (gdyż elektrony nie muszą przenikać próbki) i wynosi 1 – 30 kV. Wtedy uzyskuje się największą ilość szczegółów obserwowanej powierzchni. Stosowanie niskiego napięcia zmniejsza gromadzenie się ładunków elektrostatycznych na powierzchni próbek nieprzewodzących lub słabo przewodzących [307]. W celu zogniskowania wiązki elektronów do średnicy od 2 do 10 nm stosowane są soczewki elektromagnetyczne. Zogniskowana wiązka elektronów skanuje badaną próbkę ulegając na niej rozproszeniu. Powstałe na skutek rozproszenia elektronów sygnały rejestrowane są przez odpowiednie detektory [308]. W celu zaobserwowania kontrastu gęstościowego badanej próbki stosuje się detektory elektronów elastycznie odbitych od powierzchni próbki (BSE). W celu zobrazowania topografii powierzchni badanego materiału stosuje się detektory elektronów wybijanych z wierzchnich warstw materiału, z jego pasm przewodnictwa, czyli tzw. elektronów wtórnych (SE). Dzieje się tak w wyniku niesprężystych zderzeń wiązki elektronów z powierzchnią próbki. Ponieważ emisja wybijanych elektronów zależy od kąta padania pierwotnych elektronów na próbkę, fakt ten pozwala na uzyskiwanie informacji o nierównościach powierzchni próbki.

Wybijaniu elektronów z powierzchni badanej próbki towarzyszy również emisja promieniowania X. Promieniowanie rentgenowskie jest skutkiem wzbudzenia

elektronów próbki na wyższy poziom energetyczny przez bombardując próbkę elektrony katody. Dlatego też stosując spektrometrię dyspersji energii wtórnego promieniowania X, na czym oparta jest sonda EDS, oraz znając energię i ilość emitowanych kwantów promieniowania rentgenowskiego przez dany pierwiastek, można uzyskać informacje na temat składu pierwiastkowego próbki, a także można oszacować procentową zawartość pierwiastków w próbce [307,308,310].

Do zobrazowania badanego materiału wykorzystywane są także informacje niesione przez elektrony wstecznie rozproszone (BSE), które dostarczają informacji o występowaniu w próbce miejsc o zróżnicowanym składzie chemicznym. W wyniku zderzeń sprężystych elektronów padających na powierzchnię próbki następuje zmiana kierunku ich ruchu oraz ich energii kinetycznych [307,308,310]. Większa ilość elektronów zostaje odbita od jąder atomów o większych masach atomowych, co na obrazach SEM można zauważyć jako rozjaśnione miejsca.

## 7.5. Spektroskopia UV-Vis

Spektrofotometria UV-Vis jest techniką spektroskopową, w której wykorzystuje się promieniowanie elektromagnetyczne obejmujące zakres ultrafioletu (UV) (200 – 380 nm) oraz zakres światła widzialnego (380 – 780 nm). Barwne związki organiczne zawierające w swojej strukturze grupy chromoforowe, takie jak: etylenowa ( $-C=C-$ ), ketonowa ( $>C=O$ ), nitrowa ( $-NO_2$ ), azowa ( $-N=N-$ ), nitrozowa ( $-N=O$ ), tiokarbonylowa ( $>C=S$ ), oraz układy p-chinoidowe, absorbują promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu widzialnego lub ultrafioletowego [312]. Obecność kilku wiązań nienasyconych prowadzi do powstania tzw. efektu batochromowego, czyli przesunięcia maksimum absorpcyjnego w kierunku dłuższych fal.

W technice UV-Vis zwykle mierzy się absorbancję badanego roztworu przy określonej długości fali promieniowania elektromagnetycznego. Pochłanianie promieniowania wzbudzającego, czyli osłabienie intensywności natężenia wiązki promieniowania przy przechodzeniu przez częściowo absorbujący i rozpraszający ośrodek, opisuje prawo Lamberta-Beera, które głosi, że absorbancja ( $A$ ) jest wprost

proporcjonalna do stężenia  $c$  i grubości warstwy  $l$  roztworu, przez który przechodzi promieniowanie [313]:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon d C_m \quad 42$$

gdzie:  $I_0$  – natężenie światła padającego,  $I$  – natężenie światła po przejściu przez absorbujący ośrodek,  $\varepsilon$  – stała proporcjonalności, współczynnik pochłaniania promieniowania, tzw. molowy współczynnik absorpcji ( $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $C_m$  – stężenie molowe substancji absorbującej w roztworze ( $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$ ) i  $d$  – grubość warstwy absorbującej, czyli droga jaką pokonuje promieniowanie przechodząc przez roztwór (cm).

Podczas pomiaru absorbancji molowy współczynnik absorpcji rozpuszczalnika idealnie powinien wynieść 0. Absorbancja jest wielkością addytywną, co znaczy, że dla roztworów wieloskładnikowych, mierzona absorbancja jest sumą absorbancji poszczególnych składników roztworu:

$$A_\lambda = \sum_i^n \varepsilon_{\lambda n} C_n d = \varepsilon_{\lambda_1} C_1 d + \varepsilon_{\lambda_2} C_2 d + \dots \quad 43$$

gdzie:  $A_\lambda$  – absorbancja mierzona przy długości fali  $\lambda$  a  $C_n$  – stężenie molowe poszczególnych substancji absorbujących ( $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$ ).

Absorbancję można także przedstawić jako logarytm dziesiętny odwrotności transmitancji:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = -\log(T) = \varepsilon d C_m \quad 44$$

Zatem transmitancja wskazuje, jaka część promieniowania padającego została przepuszczona przez substancję.



## 8. Synteza mikrożeli

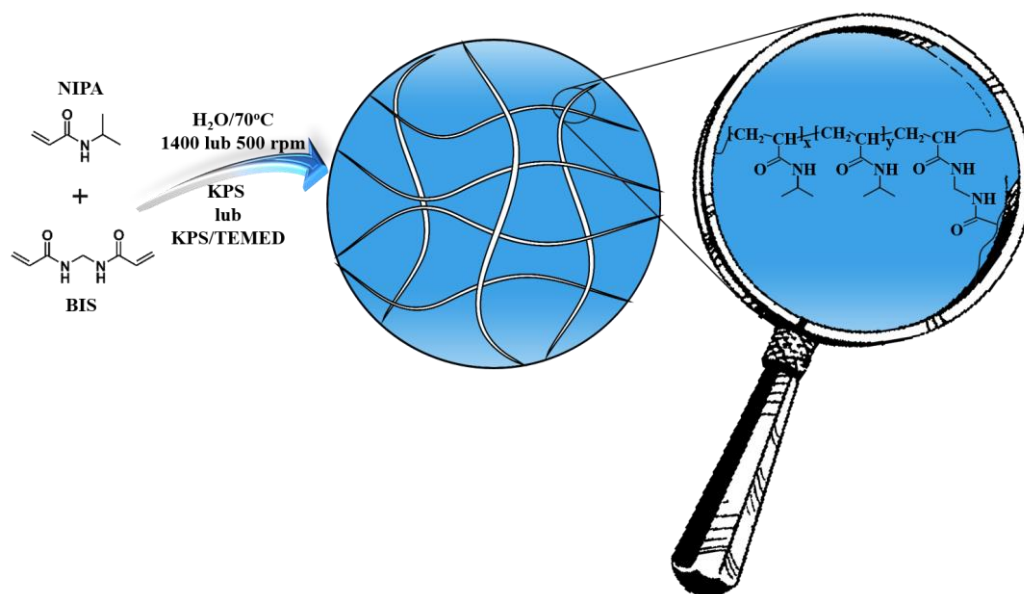
Wszystkie mikrożele otrzymałem przy użyciu polimeryzacji emulsyjnej bez udziału surfaktanta [314]. Główny budulec sieci polimerowej, monomer NIPA, przed syntezą oczyszczałem przez dwukrotną rekrystalizację z mieszaniny benzenu i heksanu (90:10 v/v). Pozostałe reagenty używałem bez wstępnego oczyszczania.

Wszystkie otrzymane mikrożele, po zakończeniu polimeryzacji chłodziłem do temperatury pokojowej oraz czyściłem za pomocą dializy, w celu usunięcia oligomerów oraz nieprzereagowanych substratów. Zawiesiny mikrożeli w wodzie umieszczałem w błonie dializacyjnej (10 kDa), a następnie błonę z mikrozelem przenosiłem do czystej wody destylowanej o objętości 5 L. Użyłem błon dializacyjnych zdolnych do zatrzymywania cząstek o masie cząsteczkowej większej niż 10000 Da. Mikrożele dializowałem do momentu, aż przewodnictwo wody/dializatu było porównywalne z przewodnictwem czystej wody. Wodę wymieniałem codziennie; cała procedura trwała dwa tygodnie. Na koniec mikrożele przepuszczałem przez strzykawkowy filtr szklany o wielkości porów 1 – 2  $\mu\text{m}$ .

### 8.1. Synteza mikrożeli pNIPA w nieobecności i obecności czynnika sieciującego BIS

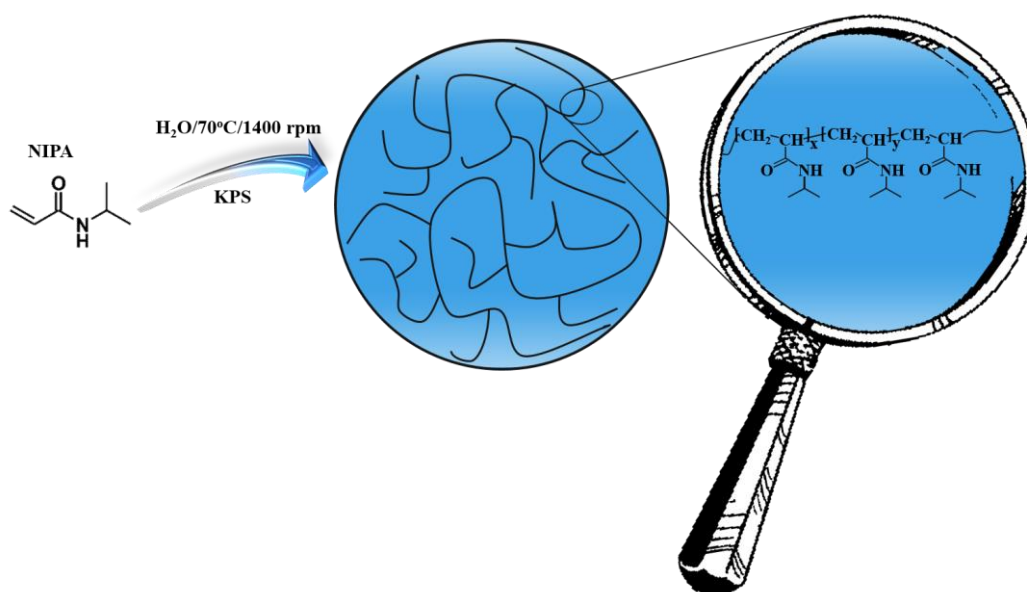
Usieciowane mikrożele p(NIPA-BIS), służące jako podłoże do syntezy mikrokompozytów p(NIPA-BIS)/PANI, otrzymałem rozpuszczając monomer NIPA (3.7 g) oraz BIS (0.05 g) w wodzie destylowanej (195 mL) i ogrzewając tę mieszaninę w termostатовanej kolbie trój-szyjnej, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne (1400 rpm), chłodnicę zwrotną oraz wlot i wylot gazu obojętnego (argonu). Roztwór monomerów ogrzany był do temperatury 70°C i przedmuchiwany argonem (przez 1 godz) w celu usunięcia tlenu. W celu zapoczątkowania polimeryzacji, do kolby reakcyjnej dodałem inicjator (odtleniony roztwór 0.1 g KPS w 5 mL wody destylowanej). Inicjator dodawałem przez septum. Reakcja polimeryzacji trwała 6 godz i prowadzona była w atmosferze argonu. Mikrożele p(NIPA-BIS) syntezowałem również w 100 mL wody i w obecności inicjatora KPS oraz TEMEDu, z szybkością mieszania 500 rpm. Stężenie sumaryczne monomeru NIPA oraz BIS utrzymywałem na

stałym poziomie (150 mM). Ułamek molowy BIS wynosił 1%. Schemat syntezy usieciowanych mikrożeli p(NIPA-BIS) przedstawia rysunek 25.



**Rysunek 25.** Schemat otrzymywania usieciowanych mikrożeli p(NIPA-BIS).

Samoczynnie usieciowane mikrożele p(NIPA) – bez udziału czynnika sieciującego – otrzymywałem rozpuszczając w 195 mL wody dejonizowanej jedynie monomer główny NIPA (100 mM). Dalsza procedura była taka sama, jak przy syntezie usieciowanych mikrożeli p(NIPA-BIS). Schemat syntezy mikrożeli pNIPA przedstawia rysunek 26.

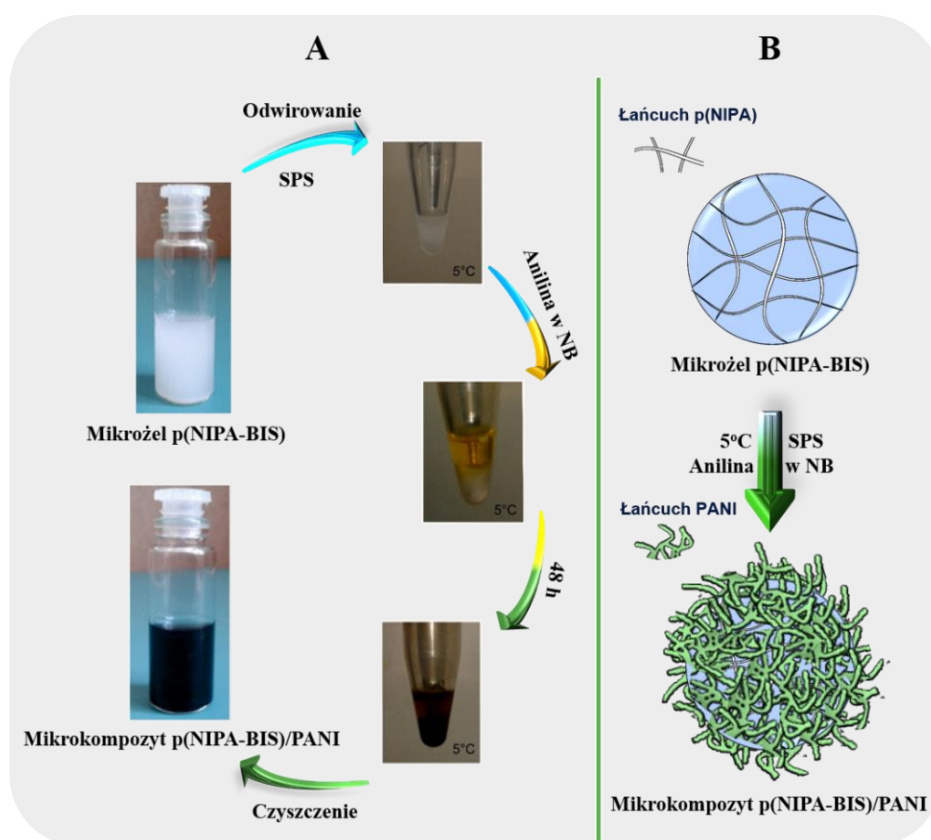


**Rysunek 26.** Schemat syntezy samoczynnie usieciowanych/splątanych pNIPA w mikrożelach bez udziału czynnika sieciującego.



## 8.2. Synteza mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI

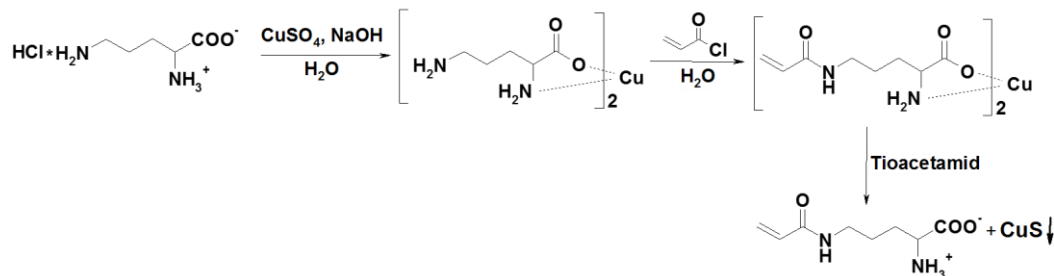
Mikrokompozyty p(NIPA-BIS)/PANI otrzymywałem za pomocą polimeryzacji dwufazowej [200]. Oczyszczony za pomocą dializy mikrożel p(NIPA-BIS) poddałem dalszej modyfikacji. Odbywało się to w temperaturze 5°C. Wodny roztwór mikrożelu p(NIPA-BIS) w stanie spęczniałym odwirowałem (14000 rpm, 30 min), następnie porcję mikrożelu (0.3 g) nasyciłem czynnikiem utleniającym – SPS (0.7 mL, 1 M). Po ok. 1 godz mikrożel odwirowałem (14000 rpm, 10 min), a roztwór (nadsącz) odrzuciłem. Następnie odwirowany mikrożel, nasączony czynnikiem utleniającym, umieściłem w roztworze aniliny (An, 0.3 mL, 0.5 M) w nitrobenzenie (NB). W ten sposób powstały dwie fazy: dolna faza mikrożelu z utleniaczem oraz górna faza – An/NB. Po 8 h utleniania otrzymany materiał oczyściłem poprzez kilkakrotne odwirowywanie i redispersję etanolem (w celu zakończenia procesu utleniania aniliny), a następnie wodą. Końcowy homogeniczny roztwór koloidalny mikrokompozytu miał barwę ciemnozieloną. Schemat przygotowania mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI przedstawia rysunek 27.



**Rysunek 27.** Schemat otrzymywania mikrokompozytów p(NIPA-BIS)/PANI (A) oraz mechanizm syntezy międzyfazowej mikrokompozytów z mikrożeli p(NIPA-BIS) (B).

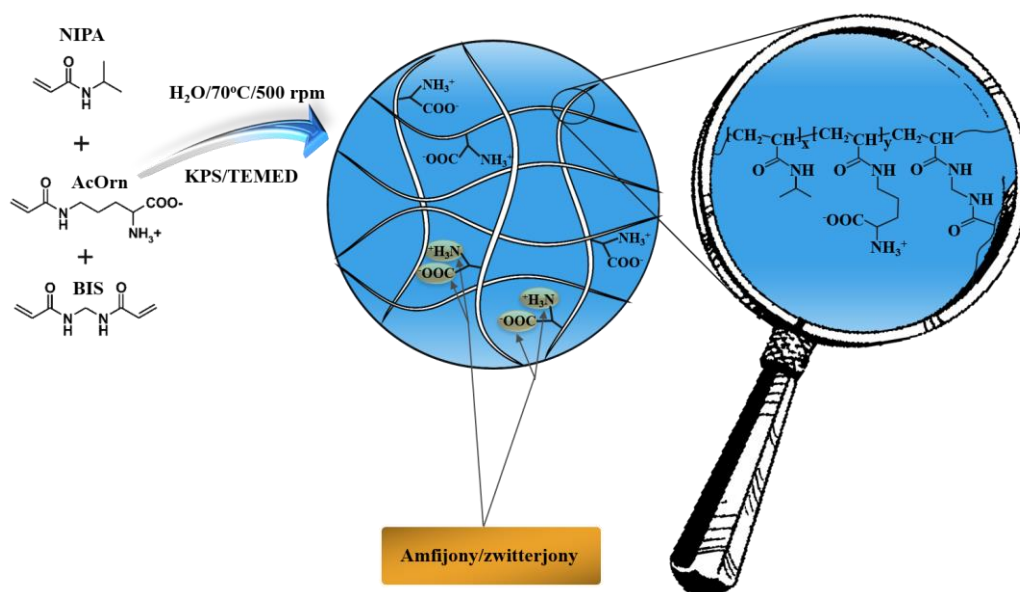
### 8.3. Synteza mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn)

Komonomer *N*-δ-akryloiloorńityna (AcOrn) był otrzymany w czteroetapowej syntezie, która jest schematycznie przedstawiona na rysunku 28.



**Rysunek 28.** Schemat syntezy *N*-δ-akryloiloorńityny.

Synteza mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn) przebiegała analogicznie do wcześniej opisanych syntez. Odpowiednie ilości monomeru głównego NIPA, czynnika sieciującego BIS oraz monomeru modyfikującego AcOrn rozpuszczałem w 95 mL wody dejonizowanej. Szybkość mieszania wynosiła 500 rpm. W celu zapoczątkowania reakcji dodawałem KPS (0.1 g rozpuszczone w 5 mL odtlenionej wody dejonizowanej) wraz z 50 μL TEMEDu. Reakcję prowadziłem przez 8 godz w atmosferze argonu. Stężenie sumaryczne monomeru NIPA, pochodnej aminokwasu oraz BIS utrzymywałem na stałym poziomie 150 mM. Schemat syntezy oraz strukturę sieci polimerowej mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn) przedstawiłem na rysunku 29.



**Rysunek 29.** Schemat syntezy oraz struktura sieci polimerowej mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn) opartego na *N*-izopropylakryloamidzie (NIPA) oraz *N*-δ-akryloiloorńitynie (AcOrn) usieciowanych za pomocą *N,N'*-metylenobisakryloamidu (BIS).

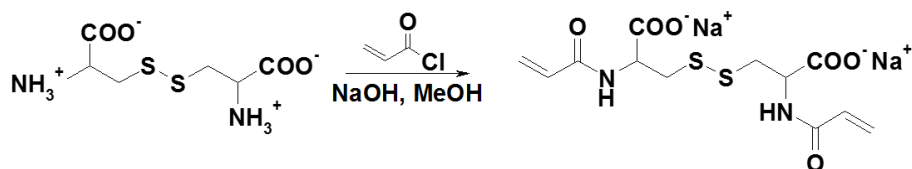
Ułamek molowy (procentowy) pochodnej aminokwasu w roztworze ( $Y_{AcOrn,roztwór}$ ) podczas syntezy mikrożeli, dany jest poniższym równaniem:

$$Y_{AcOrn,roztwór} = \frac{n_{AcOrn}}{n_{NIPA} + n_{AcOrn} + n_{BIS}} 100\% \quad 45$$

Otrzymałem mikrozele, w których zawartość pochodnej aminokwasu wynosiła: 0 – mikrożel p(NIPA-BIS), 2 – mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn2%), 8 – mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn8%), 20 – mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn20%) oraz 25% – mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn25%). Mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn25%) nie tworzył dobrze uformowanych sferycznych cząstek, a uzyskane wyniki eksperymentalne przeprowadzone techniką DLS nie były wiarygodne. Ułamek molowy BIS we wszystkich mikrożelach utrzymywałem na stałym poziomie wynoszącym 1%.

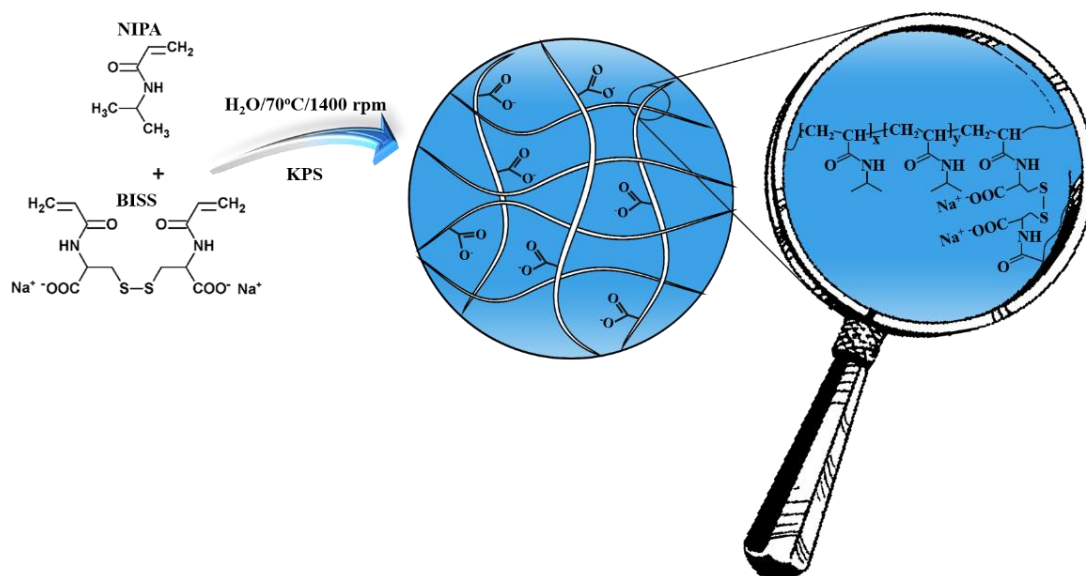
#### 8.4. Synteza mikrożeli p(NIPA-BISS)

Czynnik sieciujący *N,N'*-bis(akryloilo)cystyna był otrzymany zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 30.



**Rysunek 30.** Schemat syntezy *N,N'*-bis(akryloilo)cystyny.

Synteza mikrożeli p(NIPA-BISS) przebiegała analogicznie do wcześniejszych mikrożeli. Monomer główny NIPA oraz czynnik sieciujący BISS rozpuściłem w 195 mL wody dejonizowanej. Sumaryczne stężenie NIPA oraz pochodnej aminokwasu utrzymywałem na stałym poziomie 100 mM. Ułamek molowy pochodnej aminokwasu  $Y_{BISS,roztwór}$  w roztworze wynosił 0, 1 oraz 3%, odpowiednio dla mikrożeli: pNIPA, p(NIPA-BISS1%) oraz p(NIPA-BISS3%). Reakcja trwała 7 godz w atmosferze argonu. Schemat syntezy oraz strukturę sieci polimerowej otrzymanych mikrożeli przedstawiłem na rysunku 31.



**Rysunek 31.** Schemat syntezy oraz struktura sieci polimerowej mikrożelu p(NIPA-BISS) opartego na *N*-izopropylakryloamidzie usieciowanym za pomocą *N,N'*-bis(akryloilo)cystyny.

## 9. Mikrożel pNIPA zmodyfikowany pochodną L-ornityny

Gdy w łańcuchach polimerowych znajdują się grupy zdolne do zmiany swojego ładunku, w odpowiedzi na zmiany pH, mikrożele pNIPA nabywają nowych właściwości, takich jak czułość na zmiany pH, wzmocnienie zakresu zmian rozmiaru podczas objętościowego przejścia fazowego, zwiększenie temperatury VPT oraz możliwość zmiany objętościowego przejścia fazowego z nieciągłego w ciągłe. Mikrożele oparte na NIPA zazwyczaj kopolimeryzuje się z czułymi na pH komonomerami kwasów karboksylowych, takich jak kwas itakonowy, kwas winylooctowy oraz najczęściej kwas akrylowy (AA), ale także komonomerami kationowymi, takimi jak 4-winylopirydyna oraz chlorowodorek 2-(aminoetylo)-metakrylanu [315]. W literaturze można spotkać czule na pH amfolityczne mikrożele, otrzymane z monomerów kwasowych i zasadowych [316]. Przykładowo, zsyntezowano amfolityczne mikrożele poprzez kopolimeryzację monomeru NIPA, AA oraz *N*-(3-aminopropylo)metakryloamidu [177]. Wprowadzenie ugrupowań aminokwasowych pozwala na wbudowanie w sieć polimerową zarówno ugrupowań kwasowych jak i zasadowych, bez potrzeby używania kilku monomerów. Obecność grup aminokwasowych pozwala nadać mikrożelowi nowe właściwości, takie jak amfolityczne, katalityczne, sorpcyjne oraz czułość na pH i siłę jonową. Ponadto, zdolność grup aminokwasowych do wiązania jonów metali czyni mikrożele atrakcyjnymi sorbentami metali. Ugrupowania aminokwasowe mogą również ułatwić dalsze modyfikacje mikrożelu związkami umożliwiającymi dotarcie mikrożelu do pożądanego miejsca.

Modyfikując aminokwas L-ornitynę, przez wprowadzenie do struktury tej cząsteczki grupy akrylowej (patrz rysunek 28), otrzymałem monomer AcOrn, który następnie wbudowywałem w sieć polimerową mikrożelu. Kopolimeryzując monomer AcOrn z *N*-izopropylakryloamidem oraz czynnikiem sieciującym (BIS), zsyntezowałem nowy amfolityczny (zawierający zarówno grupy kwasowe, jak i zasadowe) mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn) (patrz rysunek 29), czuły na temperaturę oraz pH. Zbadałem wpływ temperatury, pH oraz obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  na zmiany stopnia napężnienia mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn) w zakresie od 23 do 43°C,

od 1.5 do 12.0 jednostek pH oraz od 2 do 7 jednostek pCa i pCu. Określiłem także wpływ zawartości pochodnej ornityny na zachowanie się mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn0-20%). pNIPA nadawała mikrożelowi czułość na temperaturę, zaś pochodna ornityny – ze względu na obecność grup aminokwasowych – nadawała mikrożelowi wrażliwość na zmianę pH oraz czułość na obecność niektórych jonów, o różnej zdolności tworzenia kompleksów z siecią polimerową. Zbadałem temperaturę przejścia fazowego mikrożelu oraz jaki wpływ na stopień spęcznienia mikrożelu mają zmiany pH, temperatury oraz obecność jonów dwuwartościowych. Obecność ugrupowań  $\alpha$ -aminokwasowych w sieci polimerowej mikrożelu umożliwiła, poprzez zmianę pH, kontrolę ilości ładunku oraz jego znak w sieci polimerowej.

## 9.1. Badanie wpływu pH, temperatury, obecności jonów $\text{Cu}^{2+}$ i $\text{Ca}^{2+}$ oraz zawartości *N*- $\delta$ -akryloilornityny na stan napężnienia mikrożeli

### 9.1.1. Wpływ zawartości *N*- $\delta$ -akryloilornityny na stan napężnienia mikrożeli

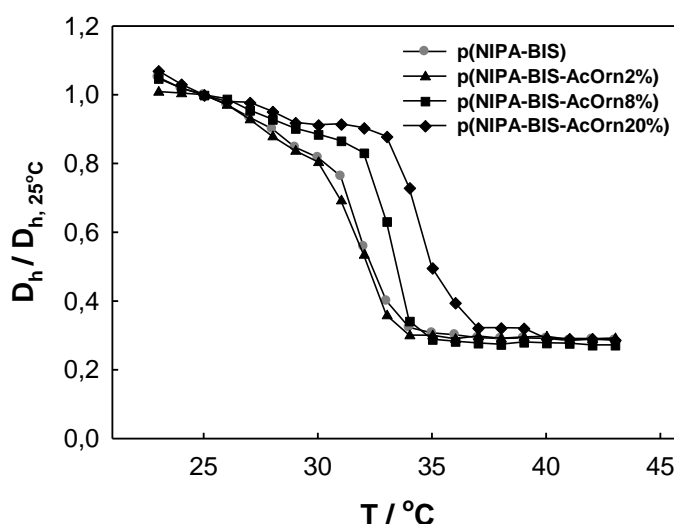
Procentową zawartość aminokwasu, jaką wbudowałem w sieć polimerową mikrożeli, obliczyłem na podstawie pomiarów NMR i umieściłem w tabeli 3. Dla mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn2%) ilość pochodnej aminokwasu, jaką udało się wbudować w sieć polimerową, była najmniejsza (oznaczona zawartość ornityny była poniżej limitu detekcji). Natomiast dla mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn20%) ilość wbudowanej w sieć pochodnej aminokwasu była największa (13%).

	Zawartość AcOrn		
Roztwór	2%	8%	20%
Mikrożel	- *	4.8%	13.0%

- \* wartość poniżej limitu detekcji

**Tabela 3.** Zawartość aminokwasu w roztworze monomerów oraz aminokwasu wbudowanego w sieć polimerową mikrożeli (oszacowana na podstawie widma  $^1\text{H}$  NMR).

Następnie zbadalem wpływ temperatury na stopień napężnienia mikrożeli, zawierających różną ilość aminokwasu (patrz rysunek 32). Wpływ temperatury na stopień napężnienia mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn) sporządziłem w oparciu o średnicę hydrodynamiczną mikrożeli w wodnej ich zawieszynie, zmierzoną za pomocą metody dynamicznego rozpraszania światła.



**Rysunek 32.** Wykresy zmian stopnia spężnienia mikrożeli przedstawione jako zmiany  $D_h/D_{h,25^\circ\text{C}}$  dla różnej zawartości aminokwasu w funkcji temperatury.

Analizując zmiany stopnia napężnienia mikrożeli zaobserwowałem, że wzrost ilości aminokwasu w mikrożelu prowadził do:

a) zmniejszenia jego rozmiaru (wartość  $D_h$  w  $25^\circ\text{C}$  wynosiła 1086, 1010, 895 oraz 605 nm odpowiednio dla p(NIPA-BIS), p(NIPA-BIS-AcOrn2%), p(NIPA-BIS-AcOrn8%) i p(NIPA-BIS-AcOrn20%)), co jest w zgodzie z danymi otrzymanymi z pomiarów SEM i TEM,

b) wzrostu VPTT. Mikrożel p(NIPA-BIS) wykazywał VPTT zgodną z wartością literaturową, tj.  $32^\circ\text{C}$  [100], natomiast VPTT mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn20%) wynosiło ok.  $35^\circ\text{C}$ .

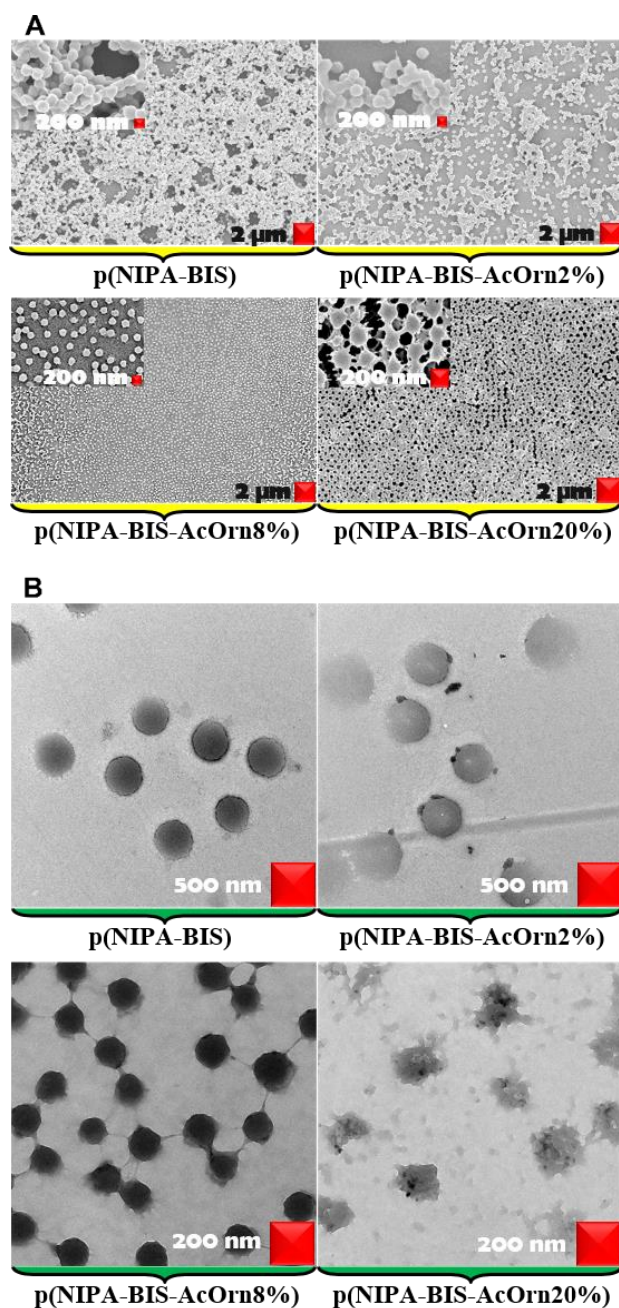
Wzrost temperatury VPT mikrożelu spowodowany był obecnością grup hydrofilowych pochodnej ornityny. Wprowadzenie do sieci polimerowej grup hydrofilowych powodowało tworzenie większej liczby wiązań wodorowych pomiędzy



tymi grupami a cząsteczkami wody, co skutkowało tym, że wyższa temperatura była potrzebna do ich zerwania i do skurczenia mikrożelu.

### 9.1.2. Morfologia mikrożeli

Morfologię mikrożeli zbadalem za pomocą pomiarów SEM oraz TEM. Wybrane zdjęcia SEM mikrożeli zawierających różną ilość AcOrn przedstawiłem na rysunku 33A.



**Rysunek 33.** Zdjęcia SEM (A) oraz TEM (B) mikrożeli p(NIPA-BIS) oraz p(NIPA-BIS-AcOrn).



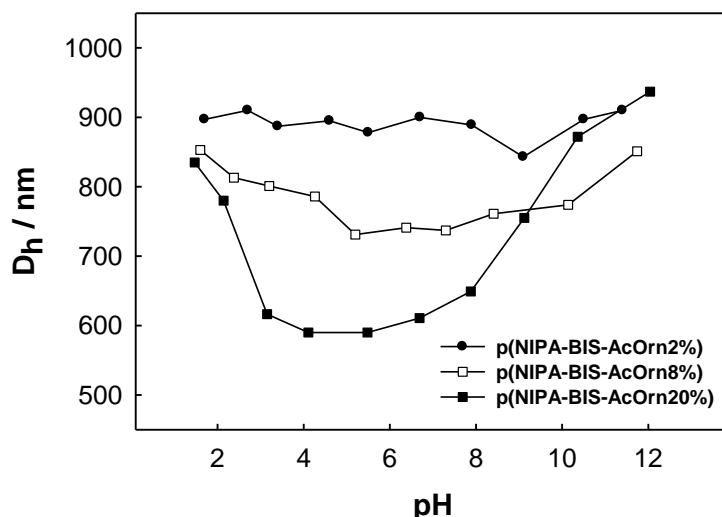
Jak można zauważyć, na zdjęciach wszystkie mikrożele występowały jako sferyczne cząstki. Jednak dla mikrożeli o względnie dużej zawartości AcOrn, tj. 8 oraz 20%, można zauważyć zdeformowanie sferycznego kształtu cząstek. Zdjęcia wykonane za pomocą TEM (patrz rysunek 33B) potwierdzają, że wzrost ilości AcOrn w mikrożelach prowadził do większej deformacji sferycznego kształtu cząstek mikrożeli. Działo się to prawdopodobnie z powodu zwiększenia samoczynnej adhezji mikrożeli o relatywnie dużej zawartości aminokwasu. Podczas procesu suszenia cząstki mikrożeli silnie deformowały się. Co więcej, analizując zdjęcia SEM i TEM, podobnie jak to było przy technice DLS, można zauważyć, że rozmiar mikrożeli zmniejszał się wraz ze wzrostem zawartości AcOrn w mikrożelach.

### 9.1.3. Wpływ pH na stan napężnienia mikrożeli

W celu zmiany pH środowiska, oczyszczone za pomocą dializy mikrożele p(NIPA-BIS-AcOrn) z różną zawartością pochodnej aminokwasu odwirowałem (14000 rpm, 30 min, 20°C), natomiast roztwór (supernatant) usunąłem. Następnie mikrożele nasyciłem nadmiarem wodnego roztworu o wybranym pH. pH zmieniałem poprzez dodawanie HCl lub NaOH. Końcową wartość pH mierzyłem tuż przed pomiarami. We wszystkich eksperymentach siłę jonową utrzymywałem na stałym poziomie (0.01 M) poprzez dodatek NaCl. Pozwoliło to na wyeliminowanie wpływu zmiany siły jonowej na równowagę stanu napężnienia. Zmiany średnicy hydrodynamicznej mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn) wyznaczyłem na podstawie danych DLS. Pomiary prowadziłem w temperaturze 25°C, czyli dużo mniejszej niż temperatura przejścia fazowego.

Rysunek 34 przedstawia zmiany rozmiarów mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn) z różną zawartością pochodnej ornityny w funkcji pH. Jak można zauważyć, rozmiary zarówno mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn2%), jak i p(NIPA-BIS-AcOrn8%) nie ulegały znacznym zmianom przy zmianie pH. Prawdopodobnie spowodowane było to tym, że zbyt mała ilość ornityny została wbudowana w sieć polimerową tych mikrożeli. Mikrożele p(NIPA-BIS-AcOrn20%) z największą ilością pochodnej aminokwasu wbudowanego w sieć mikrożelu, tj. 13%, wykazywały największą z syntezowanych mikrożeli czułość na zmiany pH. Jak można zauważyć na rysunku 34 średnica hydrodynamiczna cząstek mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn20%) w zakresie pH od 1.5 do 3 uległa gwałtownemu

zmniejszeniu. Następnie w zakresie  $3 < \text{pH} < 8$  średnica mikrożeli nie ulegała znacznym zmianom. Rozmiar mikrożeli ponownie zaczął rosnąć od pH 8. Zmiany widoczne na rysunku 34 mogą być związane z równowagą kwasowo-zasadową aminokwasu wbudowanego w sieć polimerową mikrożelu.



**Rysunek 34.** Zależności średnicy hydrodynamicznej mikrożeli z różną zawartością aminokwasu od pH, zmierzone w temperaturze 25°C.

Jak wiadomo, grupy aminokwasowe mogą znajdować się w trzech różnych formach:

- I) kationowej – istnieje sprotonowana grupa aminowa,
- II) obojętnej – istnieją: zdysocjowana grupa karboksylowa oraz sprotonowana grupa aminowa, powstaje tzw. amfijon lub zwitterjon, czyli jon obojnaczy,
- III) anionowej – istnieje zjonizowana grupa karboksylowa.

Ułamek molowy każdej z form aminokwasu ( $X_I$ ,  $X_{II}$ ,  $X_{III}$ ) można obliczyć używając poniższych równań [317]:

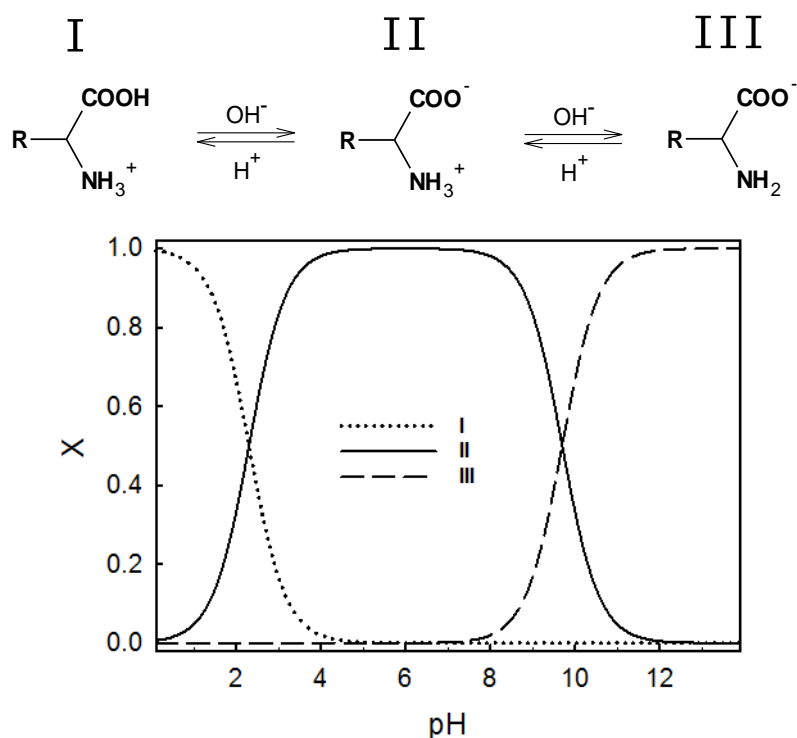
$$\frac{1}{X_I} = 1 + \frac{K_{a_1}}{[H^+]} + \frac{K_{a_1} K_{a_2}}{[H^+]^2} \quad 46$$

$$\frac{1}{X_{II}} = \frac{[H^+]}{K_{a_1}} + 1 + \frac{K_{a_2}}{[H^+]} \quad 47$$

$$\frac{1}{X_{III}} = \frac{[H^+]^2}{K_{a_1} K_{a_2}} + \frac{[H^+]}{K_{a_2}} + 1$$

48

gdzie:  $K_{a_1}$  jest stałą dysocjacji kwasowej grupy karboksylowej a  $K_{a_2}$  jest stałą dysocjacji sprotonowanej grupy aminowej. Rozkład powyższych form aminokwasu w funkcji pH przedstawiłem na rysunku 35.



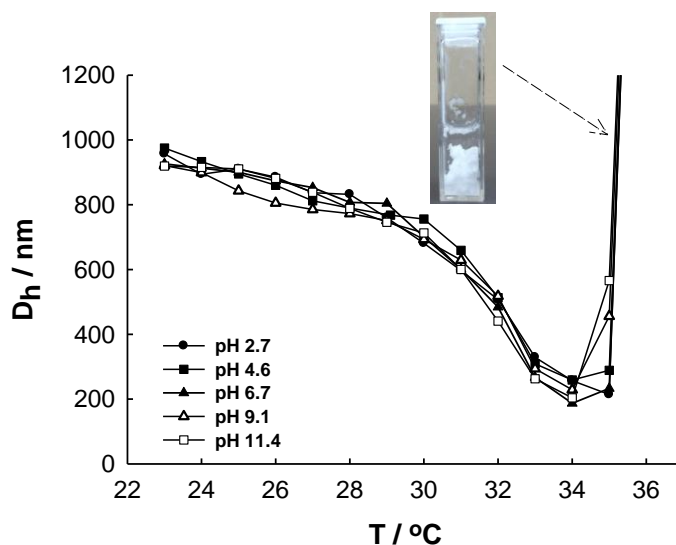
**Rysunek 35.** Rozkład poszczególnych form aminokwasowych w funkcji pH obliczony dla  $pK_{a_1} = 2.36$  i  $pK_{a_2} = 9.60$ .

Wartości  $K_{a_1}$  oraz  $K_{a_2}$  potrzebne do obliczeń przyjąłem jako równe wartościom stałych kwasowych dla wolnego alifatycznego aminokwasu (leucyny):  $pK_{a_1} = 2.36$  oraz  $pK_{a_2} = 9.60$  [318], ponieważ budowa leucyny wydaje się być najbardziej podobna do ornityny (do grup  $\alpha$ -aminokarboksylowych przyłączone są łańcuchy alifatyczne). Na rysunku 34 można zauważyć minimum charakterystyczne dla amfolytycznych sieci polimerowych [319,320]. Zakres wartości pH, w którym widoczne jest minimum, dobrze odpowiada zakresowi pH, gdzie występuje forma II aminokwasu, czyli gdy większość grup aminokwasowych znajduje się w postaci jonu obojnego. W powyższym zakresie pH oddziaływania van der Waals'a oraz oddziaływania hydrofobowe przyczyniają się do skurczenia amfolytycznej sieci polimerowej.

Natomiast niewielka ilość form I i III przyczynia się do obniżenia ciśnienia osmotycznego. Ponadto w zakresie pH odpowiadającym minimum istnieją zarówno columbowskie siły odpychania elektrostatycznego pomiędzy jednakowo naładowanymi grupami, jak i siły przyciągania columbowskiego pomiędzy ładunkami dodatnimi i ujemnymi, które prowadzą do skurczenia mikrożeli. Z drugiej strony, w odpowiednio niskim, jak i w wysokim pH zachowanie się amfolitycznej sieci polimerowej zależy od zjonizowanych form  $X_I$  albo  $X_{II}$ , gdzie mamy do czynienia z występowaniem zjonizowanych grup tylko jednego rodzaju, czyli grup dodatnich albo ujemnych. Występowanie jednoimiennych grup w sieci polimerowej mikrożelu prowadzi do wzrostu ciśnienia osmotycznego, wywołując proces pęcznienia. Ponadto jednoimienne ładunki zjonizowanych grup aminokwasowych generują siły odpychania elektrostatycznego pomiędzy łańcuchami polimerowymi, co prowadzi do dalszego pęcznienia sieci polimerowej.

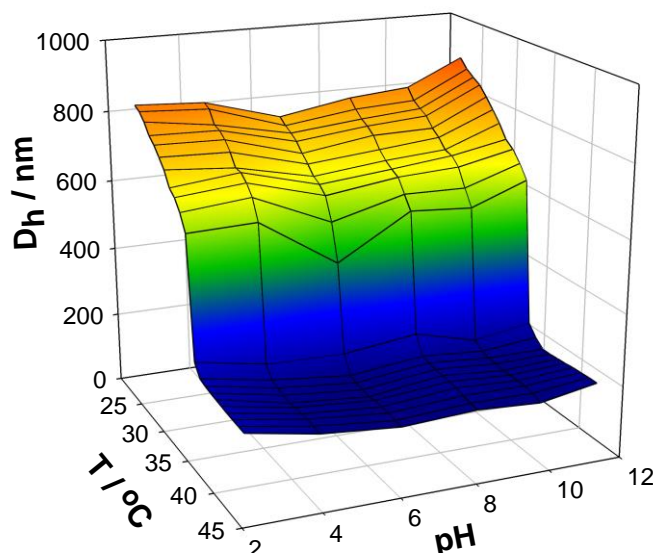
W celu dalszej charakteryzacji mikrożeli zbadałem wpływ temperatury na stopień napęcznienia mikrożeli o różnej zawartości AcOrn w wybranych wartościach pH. Badania te pozwoliły mi zbadać wpływ ilości oraz znaku ładunków na stopień napęcznienia mikrożeli. Ilość oraz znak ładunków kontrolowałem za pomocą zmiany pH. Wyniki otrzymane dla mikrożeli o zawartości AcOrn równej 2% przedstawiłem na rysunku 36, natomiast dla mikrożeli zawierających 8 oraz 20% pochodnej aminokwasu przedstawiłem na trójwymiarowych wykresach – rysunek 37 i 38. W alkalicznym pH na łańcuchach polimerowych przeważają ładunki dodatnie, w pH kwaśnym ładunki ujemne, natomiast w pH ok. 6 wypadkowy ładunek na łańcuchach polimerowych jest bliski zeru, czyli bliski punktowi izoelektrycznemu. Mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn2%) z najmniejszą zawartością ornityny wykazywał zjawisko flokulacji we wszystkich badanych wartościach pH w roztworach o mocy jonowej 0.01 M, wraz ze wzrostem temperatury. Flokulacja polegała na tym, że w temperaturach powyżej temperatury VPTT mikrożel tracił stabilność i strącał się w postaci kłaczków, czemu towarzyszył nagły wzrost rozmiarów (na wykresie rozmiar wykracza poza skalę). Powyższe zjawisko jest typowe dla niezmodyfikowanych mikrożeli p(NIPA-BIS), które ze względu na mały ładunek, w roztworach o odpowiednio wysokiej mocy jonowej tracą swoją stabilność i strącają się wraz ze wzrostem temperatury. Fenomen tego zjawiska opisałem w rozdziałach 4.4 („Stabilność koloidalna mikrożeli”) oraz 4.6.5 („Wpływ siły

jonowej”). Mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn2%) we wszystkich zbadanych wartościach pH flokulował po osiągnięciu temperatury ok. 35°C.



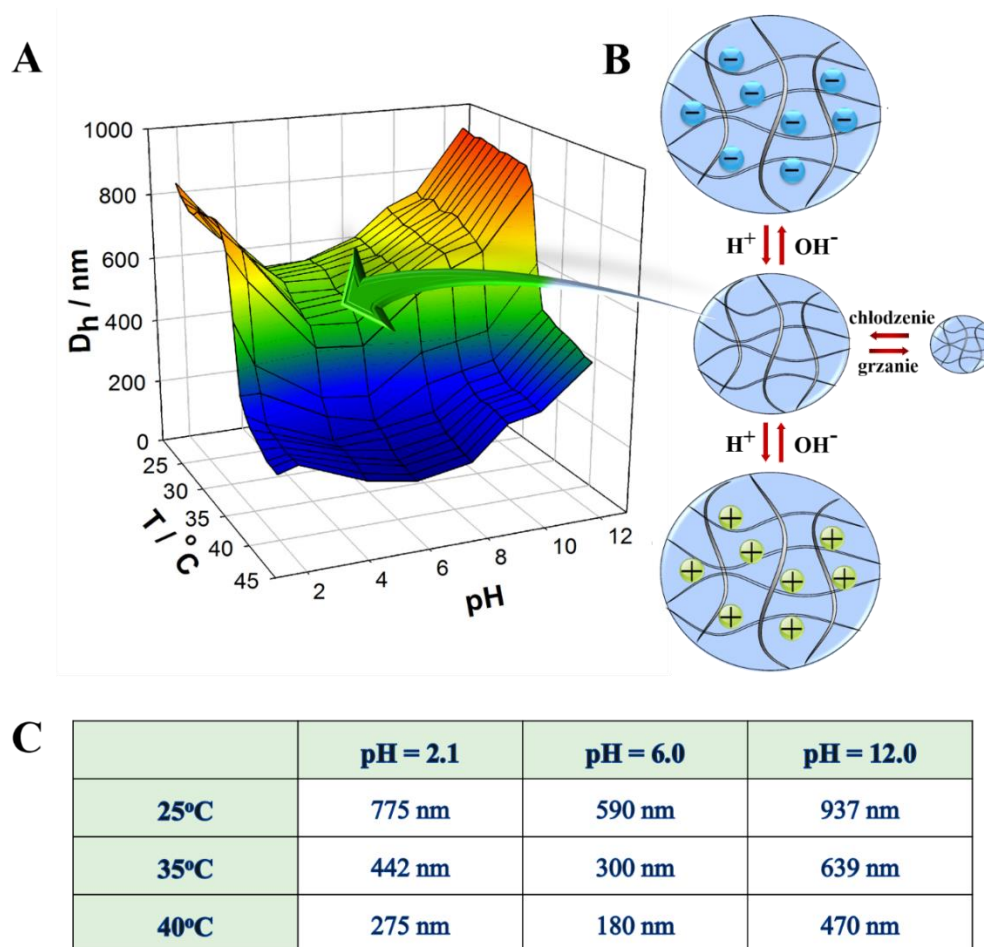
**Rysunek 36.** Wykresy przedstawiające średnice hydrodynamiczne mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn2%) w funkcji temperatury i pH. Moc jonowa była utrzymywana na stałym poziomie (0.01 mol L<sup>-1</sup>). Mikrożele w temperaturze 36°C tworzyły duże agregaty, których rozmiar wykraczał poza skalę na wykresie.

Mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn8%), ze względu na większą ilość wbudowanej w sieć ornityny, był stabilny w całym badanym zakresie pH i nie flokulował, jednak zbyt mała ilość ornityny wbudowana w sieć mikrożelu, tj. ok. 5%, powodowała, że mikrożel wykazywał niewielką czułość na zmiany pH. W całym badanym zakresie pH widoczna jest gwałtowna zmiana rozmiaru w okolicach 32°C. W zakresie pH, w którym dominowały amfijony, rozmiar mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn8%) był najmniejszy, zarówno przed jak i po przejściu fazowym. Mikrożel kurczył się całkowicie w temperaturach powyżej 33°C. W skrajnych wartościach pH mikrożele wykazywały nieznacznie większą średnicę przed oraz po przejściu fazowym. Brak znaczącego wpływu pH na przejścia fazowe wywołane wzrostem temperatury spowodowane było tym, że ze względu na niską zawartość aminokwasu w strukturze mikrożelu powstawało zbyt mało zdysocjowanych grup, przy zachowaniu mocy jonowej na stałym poziomie, dla wszystkich wartości pH.



**Rysunek 37.** Trójwymiarowy diagram prezentujący średnicę hydrodynamiczną mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn8%) w funkcji temperatury i pH. Moc jonowa była utrzymywana na stałym poziomie ( $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Natomiast dla mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn20%) można zauważyć, że ze względu na większą niż w przypadku pozostałych mikrożeli, zawartość ornityny, tj. 13%, temperatura oraz pH miały dużo silniejszy wpływ na rozmiar oraz przejście fazowe mikrożeli. W zakresie pH, w którym dominują amfijony, rozmiar mikrożeli był najmniejszy, zarówno przed jak i po przejściu fazowym. Dla wartości pH równej 6.36, która jest bliska wartości punktu izoelektrycznego, wszystkie grupy aminokwasowe przyjmowały formę amfijonu. W tej wartości pH mikrożełe p(NIPA-BIS-AcOrn20%) w całym badanym zakresie temperatur ( $23 - 43^\circ\text{C}$ ) były bardziej skurczone niż w pozostałych wartościach pH. Natomiast najbardziej skurczony stan mikrożel osiągał w temperaturach powyżej  $35^\circ\text{C}$ . Obecność amfijonów w sieci polimerowej mikrożelu powodowała, że rozmiar mikrożelu był mniejszy, w temperaturze poniżej i powyżej przejścia fazowego, niż rozmiar mikrożelu zawierającego w sieci jony jednoimienne. Średnica mikrożelu w temperaturze  $T = 25^\circ\text{C}$ , przy zmianie pH z 2.1 na 6.0, uległa zmniejszeniu o 24%, a w  $T = 40^\circ\text{C}$  zmalała o 35%. Natomiast średnica mikrożelu przy zmianie pH z 12.0 na 6.0 zmalała o 37% i o 62% odpowiednio dla  $T = 25$  i  $40^\circ\text{C}$ . Obecność zwitterjonów w mikrożelu prowadziła do zmniejszenia ciśnienia osmotycznego oraz zwiększenia sił przyciągania elektrostatycznego pomiędzy jonami obojnymi, co ostatecznie stabilizowało osiągnięcie bardziej skurczonego stanu w całym badanym zakresie temperatur.



**Rysunek 38.** A) trójwymiarowy diagram przedstawiający średnicę hydrodynamiczną mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn20%) w funkcji temperatury i pH. Moc jonowa była utrzymywana na stałym poziomie ( $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ ). B) schemat kurczenia mikrożelu na skutek zmian pH. C) wartości średnic hydrodynamicznych mikrożelu dla charakterystycznych punktów na wykresie, przedstawione tabelarycznie.

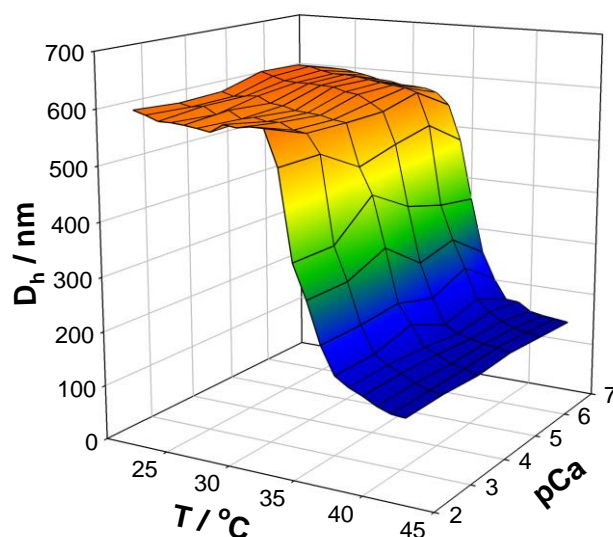
Przyjąłem (na podstawie danych eksperymentalnych otrzymanych dla mikrożelu o największej czułości na zmiany pH, tj. dla mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn20%)), że wartość punktu izoelektrycznego, odpowiada wartości pH, przy której mikrożel był najbardziej skurczony, czyli w minimum na rysunku 34. Obliczona w ten sposób wartość punktu izoelektrycznego wynosiła 6.3. W skrajnych wartościach pH mikrożele p(NIPA-BIS-AcOrn20%) wykazywały większą średnicę przed oraz po przejściu fazowym, patrz rysunek 38. Ponadto w skrajnych wartościach pH zmieniał się charakter przejścia fazowego z nieciągłego w ciągły. W zakresie temperatur  $37 - 42^\circ\text{C}$  (po przejściu fazowym) można zaobserwować silny wpływ temperatury i pH na średnicę hydrodynamiczną mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn20%). Warto zwrócić uwagę, że dla pH zbliżonego do 2.0 większość grup aminokwasowych przyjmuje formę I, natomiast gdy wartość pH zbliżona jest do 12, większość zjonizowanych grup

występuje w formie III (patrz rysunek 35). Podobny wpływ pH na temperaturowe przejście fazowe mikrożeli na bazie pNIPA, zawierających w sieci polimerowej mieszaninę monomerów zasadowych i kwasowych, opisany jest w literaturze [316].

#### 9.1.4. Wpływ obecności jonów metali ciężkich na stan napężnienia mikrożeli

Do zbadania wpływu obecności jonów metali na pęcznienie oraz przejście fazowe mikrożeli wybrałem mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn20%), ponieważ jako jedyny z syntezowanych mikrożeli wykazywał wrażliwość na jony metali. Wybrałem dwa jony: wapnia(II) oraz miedzi(II).

Oczyszczone za pomocą dializy, a następnie odwirowane mikrożele (14000 rpm, 30 min, 20°C), nasyciłem nadmiarem wodnego roztworu jonu metalu o różnym stężeniu ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Siłę jonową utrzymywałem na stałym poziomie (0.01 M) poprzez dodatek NaCl, w celu wyeliminowania wpływu zmian siły jonowej na równowagę stanu napężnienia. Wartość pH do badań wybrałem jako 6.0; starałem się, aby była stabilna, bo zmiana pH mogła powodować zmiany rozmiarów/napężnienia mikrożeli. Wpływ temperatury na stopień napężnienia mikrożeli poddanych oddziaływaniu jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  o różnych stężeniach przedstawiłem na trójwymiarowych wykresach, na rysunkach 39 i 40.

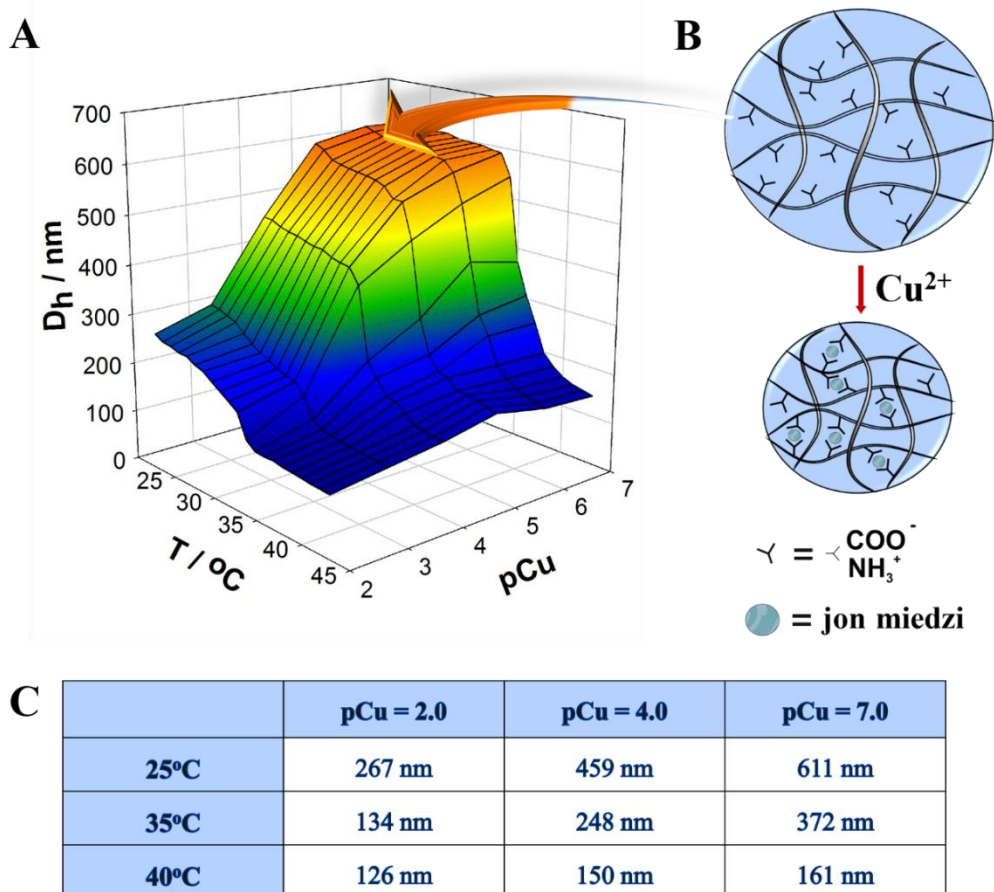


**Rysunek 39.** Trójwymiarowy diagram reprezentujący średnicę hydrodynamiczną mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn20%) w funkcji temperatury i stężenia jonów wapnia. Moc jonowa była utrzymywana na stałym poziomie (0.01 mol L<sup>-1</sup>).



W przypadku jonów wapnia (patrz rysunek 39) temperatura przejścia fazowego mikrożeli nie uległa znacznym zmianom pod wpływem badanego zakresu stężeń jonów wapnia. Mikrożele wykazywały jedynie wrażliwość na zmiany temperatury i osiągały stan skurczony w temperaturach powyżej 35°C dla każdej stosowanej wartości pCa.

W przypadku jonów miedzi (patrz rysunek 40) mikrożele wykazywały czułość zarówno na zmiany temperatury, jak i zmiany stężenia jonów metalu. Zaobserwowałem spadek stopnia spęcznienia wraz ze wzrostem stężenia  $\text{Cu}^{2+}$ . Dla mniejszych stężeń jonów miedzi (0.1 – 10  $\mu\text{M}$ ) mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn20%) ulegał objętościowemu przejściu fazowemu w temperaturze ok. 35°C, natomiast dla dużego stężenia  $\text{Cu}^{2+}$  (1 mM) przejście fazowe obserwowałem w temperaturze ok. 33°C. Indukowane wzrostem temperatury zmiany stopnia spęcznienia były już stosunkowo niewielkie dla  $\text{pCu} < 3$ .



**Rysunek 40.** A – trójwymiarowy diagram przedstawiający średnicę hydrodynamiczną mikrożelu p(NIPA-BIS-AcOrn20%) w funkcji temperatury i stężenia jonów miedzi. Moc jonowa była utrzymywana na stałym poziomie (0.01 mol L<sup>-1</sup>). B – schemat kurczenia mikrożelu po dodaniu  $\text{Cu}^{2+}$ . C – wartości średnic hydrodynamicznych mikrożelu dla charakterystycznych punktów na wykresie, przedstawione tabelarycznie.

Jeżeli chodzi o średnicę hydrodynamiczną mikrożelu, to przy zmianie pCu z 7 na 2 zmalała ona o 56 i 22% odpowiednio dla  $T = 25$  i  $40^{\circ}\text{C}$ . Opisane zmiany stopnia spęczenia mikrożeli można wytłumaczyć tworzeniem kompleksów pomiędzy jonami metalu a grupami aminokwasu, przyłączonego do łańcuchów polimerowych mikrożelu. Wiadomo, że aminokwasy mogą tworzyć trwałe kompleksy z niektórymi kationami metali. Zazwyczaj tworzone są dwa rodzaje kompleksów: o stechiometrii 1:1 oraz 1:2 [321,322]. Obecność takich kompleksów w żelu ma ewidentnie wpływ na jego stopień spęczenia. Tworzenie kompleksu 1:1 powinno prowadzić do pęcznienia sieci polimerowej, spowodowanego wprowadzeniem nadmiernego ładunku dodatniego do łańcuchów polimerowych, co powoduje wzrost ciśnienia osmotycznego pomiędzy roztworem a żelem. Kompleks o stechiometrii  $\text{MeL}_2$  zwiększa usieciowanie żeli i prowadzi do zwiększenia gęstości sieci polimerowej, w każdych warunkach. Jony miedzi tworzą kompleksy z aminokwasami o stosunkowo wysokich stałych trwałości. Przykładowo, wartości stałych trwałości dla kompleksów z glicyną (niezwiązanej z żelem) wynoszą:  $\log \beta_{\text{ML}} = 8.1$  oraz  $\log \beta_{\text{ML}_2} = 15.3$ . Słaby wpływ jonów wapnia na stopień spęczenia mikrożeli można wytłumaczyć tworzeniem bardzo słabych kompleksów. Dla glicyny mamy tylko stechiometrię 1:1 i odpowiadający jej  $\log \beta_{\text{ML}} = 1.4$  [323].

## 9.2. Podsumowanie

Stosując polimeryzację emulsyjną bez udziału surfaktanta, otrzymałem kilka nowych mikrożeli opartych na *N*-izopropylakryloamidzie oraz naturalnym aminokwasie – L-ornitynie, zmodyfikowanym grupą akrylową. Poprzez kopolimeryzację amfolitycznego monomeru *N*- $\delta$ -akryloilornityny z *N*-izopropylakryloamidem oraz *N,N'*-metylenobisakryloamidem otrzymałem nowy amfolityczny mikrożel. Zastosowanie pochodnej ornityny eliminuje konieczność jednoczesnego wprowadzania dwóch monomerów, jednego o charakterze kwasowym i drugiego zasadowego, i tym samym prowadzi do szybszej syntetycznie rozwiniętej modyfikacji pierwotnego mikrożelu. Zbadałem wpływ pH, temperatury, stężenia jonów metali oraz zawartości monomeru modyfikującego na stopień napęczenia mikrożeli. Obecność aminokwasu w sieci polimerowej mikrożeli dała możliwość kontrolowania ilości ładunków dodatnich oraz ujemnych w sieci polimerowej mikrożeli przez

odpowiedni dobór wartości pH. Grupy aminokwasowe w mikrożelu mogły występować w postaci kationu ( $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{COOH}$ ), anionu ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COO}^-$ ) oraz jonu obojnego ( $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{COO}^-$ ), zwanego zwitterjonem lub amfijonem.

Mikrożele z 2% zawartością aminokwasu były niestabilne w badanym zakresie pH i agregowały po przekroczeniu temperatury objętościowego przejścia fazowego. Mikrożele z 8% zawartością AcOrn były stabilne w badanym zakresie pH i temperatury, wykazywały wrażliwość na zmiany temperatury, natomiast wrażliwość na zmiany pH była niewielka. Mikrożele z 20% zawartością aminokwasu wykazywały największe zmiany stopnia spęczenia w odpowiedzi na zmiany temperatury, pH oraz stężenia jonów metali. W zakresie pH, w którym dominują zwitterjony, rozmiary mikrożeli były najmniejsze w każdych warunkach: przed i po przejściu fazowym. Powodowała to obecność amfijonów, prowadząca do zmniejszenia ciśnienia osmotycznego i zwiększenia sił przyciągania elektrostatycznego pomiędzy grupami o różnoimiennych ładunkach. Oszacowany teoretyczny przedział pH, w którym występują amfijony, zgadzał się z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi dla mikrożelu. Obecność aktywnych grup  $\alpha$ -aminokwasowych przyczepionych do sieci polimerowej umożliwiła kompleksowanie niektórych kationów metali. Badając wpływ obecności  $\text{Cu}^{2+}$  oraz  $\text{Ca}^{2+}$  na napęczenie mikrożeli (jony te różniły się znacznie zdolnością do tworzenia kompleksów z  $\alpha$ -aminokwasami), okazało się, że obecność jonów miedzi, które tworzą stabilne kompleksy z  $\alpha$ -aminokwasem, miała silny wpływ na stopień napęczenia badanych mikrożeli. Obecność jonów miedzi(II) skutkowałą zmniejszeniem rozmiarów mikrożeli, w każdych badanych przeze mnie warunkach.

Zdolność mikrożeli do wiązania jonów metali ciężkich oraz ich czułość na zmiany pH i temperatury czyni je interesującymi materiałami w procesach ekstrakcji. Siłę wiązania metali ciężkich można kontrolować zmianą pH i temperatury. Ponadto obecność wolnych grup  $\alpha$ -aminokwasowych, przyłączonych do sieci polimerowej, stwarza możliwość dalszej modyfikacji mikrożelu, np. białkami, poprzez utworzenie wiązania z grupą  $\alpha$ -aminokwasową. Poprzez odpowiednią zmianę pH bądź temperatury można by mieć wpływ na stopień spęczenia mikrożeli, równowagę hydrofilową/hydrofobową oraz stabilność wiązań peptydowych/estrowych, co umożliwia uwolnienie – wcześniej związanego z mikrożelem – białka. Ponadto,

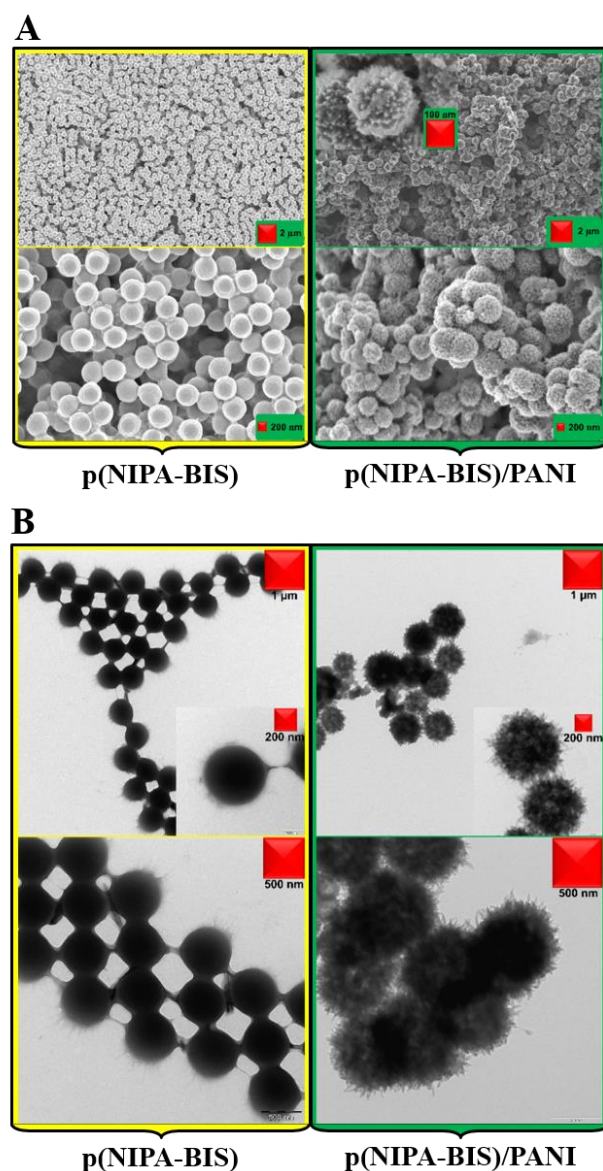
otrzymane mikrożele są interesujące z punktu widzenia systemów dostarczania leków. Szczególnie interesujący wydaje się być mikrożel p(NIPA-BIS-AcOrn20%), ponieważ wykazywał on dużą czułość na zmiany pH we wszystkich badanych temperaturach, w tym w temperaturze zbliżonej do temperatury ludzkiego ciała.

## 10. Kompozyt mikrożelu pNIPA z polianiliną

Polianilina (PANI) jest dobrze poznanym oraz często stosowanym polimerem przewodzącym, wykazującym – w odpowiednim stanie – wysokie przewodnictwo elektronowe ( $10^{-1} - 10^2 \text{ S cm}^{-1}$ ). Posiada ona również aktywność elektrochemiczną [324]. W celu nadania czułości na temperaturę mikrożelowi pNIPA dodatkowych cech: przewodności oraz elektroaktywności, zsyntezowałem, za pomocą procedury międzyfazowej, mikrokompozyt, składający się z usieciowanego polimeru pNIPA oraz polimeru przewodzącego – polianiliny (PANI). Najpierw, za pomocą polimeryzacji emulsyjnej bez udziału surfaktanta, otrzymałem mikrożel p(NIPA-BIS). Po nasyceniu go roztworem czynnika utleniającego (nadsiarczanu sodu), a następnie umieszczeniu go w roztworze aniliny w nitrobenzenie, nastąpiło tworzenie łańcuchów polianiliny w mikrożelu p(NIPA-BIS). Polianilina posiada wiele wewnętrznych stanów redoks, ale jedynie sól emeraldyny cechuje się wysoką przewodnością elektryczną. Przy użyciu takich technik, jak SEM, TEM, CV oraz DLS, zbadałem strukturę, morfologię, elektroaktywność, przewodnictwo elektryczne oraz wpływ polianiliny na stopień spęcznienia i temperaturę przejścia fazowego tego mikrokompozytu.

### 10.1. Morfologia mikrokompozytu

Morfologię mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI zbadałem przy użyciu mikroskopu elektronowego. Rysunek 41A przedstawia zdjęcia SEM mikrokompozytu oraz, dla porównania, mikrożelu p(NIPA-BIS), stanowiącego podłoże do przygotowania kompozytu. Jak można zauważyć, niezmodyfikowany mikrożel tworzył sferyczne cząstki o gładkiej i jednorodnej powierzchni. Struktura mikrokompozytu znacząco różniła się od niezmodyfikowanego mikrożelu. Mikrokompozyt również tworzył sferoidalne cząstki, jednak na zdjęciach SEM wyraźnie widać, że cząstki mają kalafiorowatą oraz chropowatą morfologię. Polimer przewodzący tworzy nanowłókna, które pokrywały powierzchnię cząstek mikrożelu p(NIPA-BIS) i znacznie zmieniały morfologię mikrokompozytu.

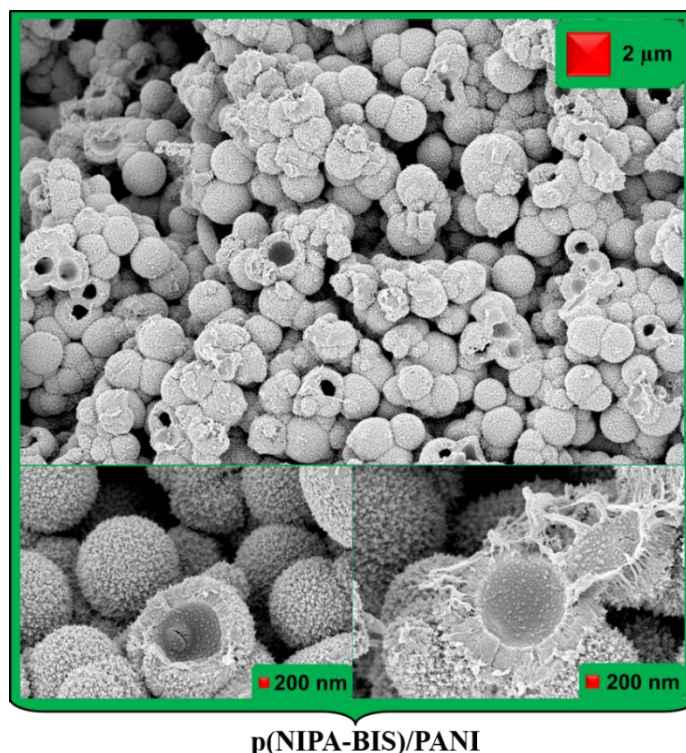


**Rysunek 41.** Zdjęcia SEM (A) oraz TEM (B) mikrożeli p(NIPA-BIS) oraz mikrokompozytów p(NIPA-BIS)/PANI.

Mikrokompozyt zbadalem również za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Zdjęcia TEM (patrz rysunek 41B) potwierdzają, że PANI tworzyła nanowłókna; są one widoczne na całej powierzchni cząstek mikrożelu. Analiza zdjęć TEM pozwala stwierdzić, że włókna PANI były dość równomiernie rozmieszczone w całej objętości cząstek mikrożelu p(NIPA-BIS). Rozmiary cząstek, szacowane na podstawie analizy zdjęć dwóch mikroskopii elektronowych: SEM i TEM, były podobne; nie różniły się więcej niż o 7%. Średni rozmiar cząstek mikrokompozytu był większy niż rozmiar niezmodyfikowanego mikrożelu (650 vs. 450 nm). Ta różnica w rozmiarach cząstek prawdopodobnie spowodowana była zmianami w oddziaływaniu

łańcuchów między sobą, po wypełnieniu porów w p(NIPA-BIS) i tworzeniem polianiliny na powierzchni tych mikrożeli.

W celu potwierdzenia penetracji sferycznych cząstek mikrożelu przez łańcuchy PANI, zbadałem morfologię zliofilizowanych próbek mikrokompozytu za pomocą SEM. Odpowiednie zdjęcia przedstawiłem na rysunku 42.



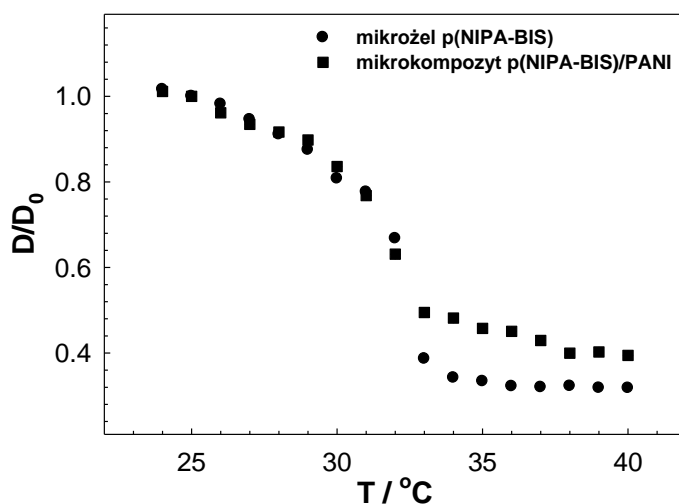
**Rysunek 42.** Zdjęcia SEM zliofilizowanych mikrokompozytów p(NIPA-BIS)/PANI. Zakończenia włókien PANI widoczne są na wewnętrznej powierzchni otwartych sfer.

Proces liofilizacji doprowadził do utworzenia sfer o pustym wnętrzu, nie zmieniając ich kształtów oraz nie zmieniając znacząco ich rozmiarów. Ostatecznie, rozmiar zliofilizowanych mikrokompozytów był tylko nieznacznie mniejszy od rozmiaru obiektów w stanie spęczniałym, zmierzonym z wykorzystaniem techniki DLS. Zakończenia włókien PANI są widoczne na wewnętrznej powierzchni zniszczonych/pękniętych sfer, co znaczy, że PANI penetrowała sieć polimerową mikrożelu. Tworzenie się pustych sfer prawdopodobnie spowodowane było procesem liofilizacji. Liofilizacja wymagała umieszczenia żelowych mikrosfer w ciekłym azocie (szybkie zamrożenie), a następnie zachodził proces sublimacji lodu. W takich warunkach kształt zliofilizowanych cząstek mikrokompozytu zależał od szybkości

krystalizacji wody i jednoczesnego wzrostu jej objętości. Dzięki sublimacji wody powstały kapsułki puste w środku.

## 10.2. Badanie przejść fazowych

Wpływ temperatury na stopień spęcznienia mikrożelu p(NIPA-BIS) oraz mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI przedstawiłem w postaci zmian średnicy hydrodynamicznej mikrożeli względem temperatury. Na rysunku 43 pokazany jest wpływ temperatury na stopień spęcznienia mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI oraz niezmodyfikowanego mikrożelu p(NIPA-BIS).

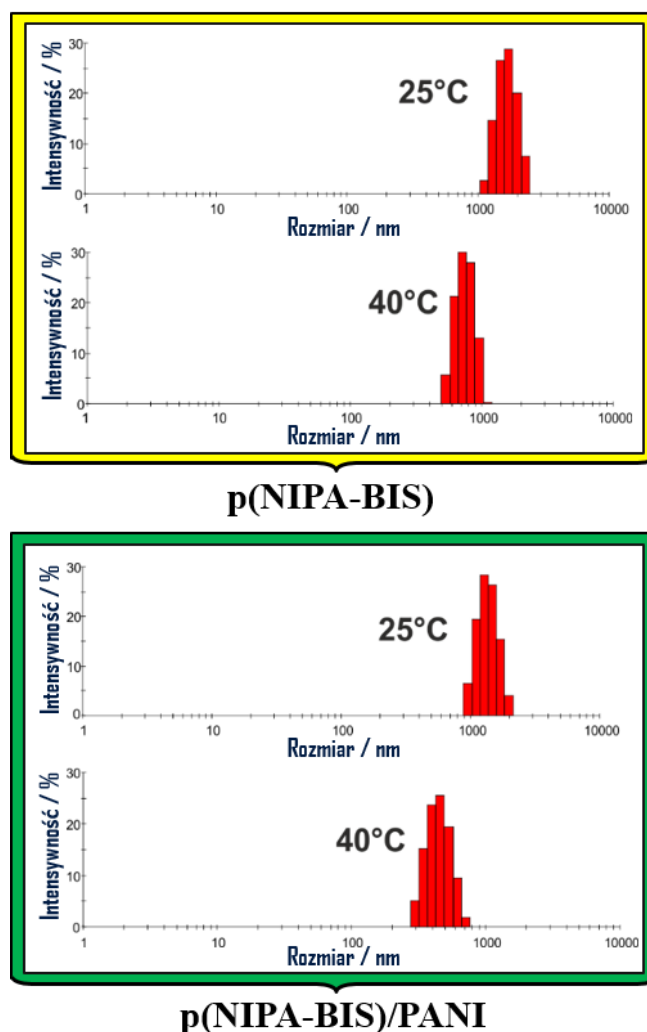


**Rysunek 43.** Zależność stopnia spęcznienia czystego mikrożelu p(NIPA-BIS) oraz mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI od temperatury. Średnicę hydrodynamiczną badanych obiektów znormalizowałem względem jej wartości w temperaturze 25°C.

Średnicę hydrodynamiczną (znormalizowaną względem średnicy cząstek w stanie spęczniałym w 25°C) wykreśliłem w funkcji temperatury. Wpływ temperatury na stopień spęcznienia obu materiałów był podobny. Usieciowany mikrożel p(NIPA-BIS) oraz usieciowany kompozyt p(NIPA-BIS)/PANI ulegały objętościowemu przejściu fazowemu, ze stanu spęczniałego w stan skurczony, w temperaturze ok. 33°C. Mikrokompozyt zachował termo-czułość charakterystyczną dla mikrożelu p(NIPA-BIS). Znikoma różnica w VPTT tych dwóch materiałów wskazuje na bardzo słabe oddziaływania pomiędzy polimerem przewodzącym a siecią polimerową mikrożelu p(NIPA-BIS). PANI była jedynie fizycznie uwięziona w sieci polimerowej mikrożelu p(NIPA-BIS). Zaletą tej sytuacji było to, że PANI pozostała niezależnym,



niezmodyfikowanym znacznikiem/markerem redoks. Na rysunku 44 przedstawiłem rozkład średnicy hydrodynamicznej cząstek mikrożelu p(NIPA-BIS) oraz mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI w temperaturze 25 oraz 40°C. Średnia wartość średnicy hydrodynamicznej cząstek mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI wynosiła ok. 1700 oraz 700 nm, natomiast dla mikrożelu p(NIPA-BIS) ok. 1300 oraz 500 nm, odpowiednio w 25 oraz 40°C.



**Rysunek 44.** Rozkład średnicy hydrodynamicznej cząstek mikrożelu p(NIPA-BIS) oraz mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI w stanie spęczniałym (25°C) oraz w skurczonym (40°C).

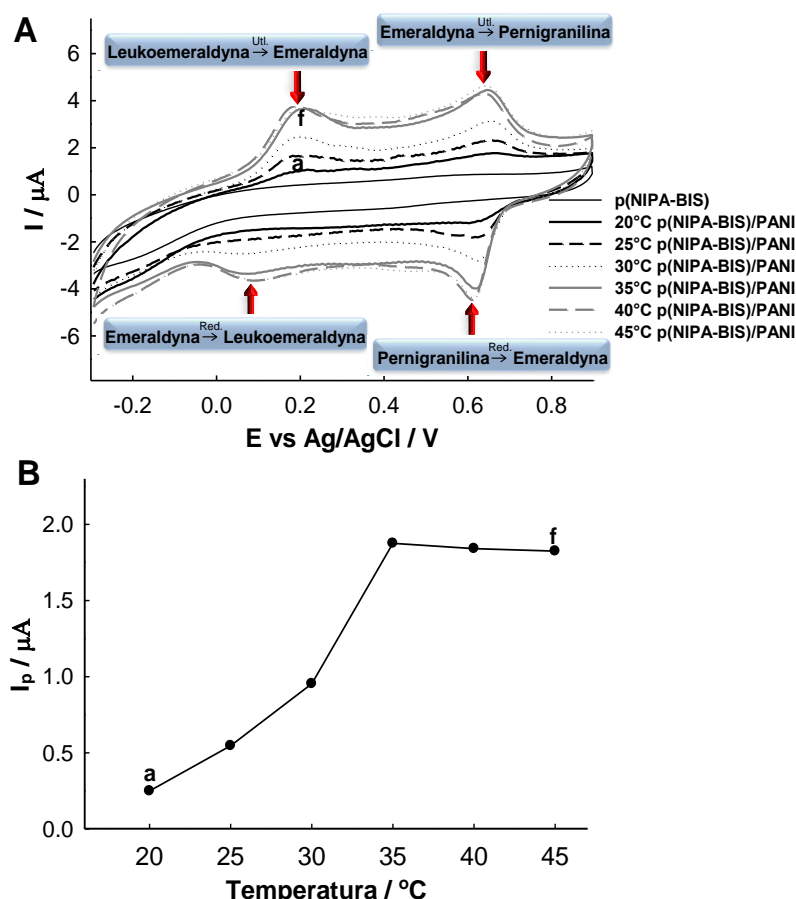
### 10.3. Właściwości elektrochemiczne mikrokompozytu

Kolejnym etapem mojej pracy było zbadanie właściwości elektrycznych oraz elektrochemicznych mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI. W celu zbadania przewodnictwa właściwego otrzymanych obiektów, odwirowaną (14000 rpm, 30 min,

25°C) porcję mikrożelu lub mikrokompozytu (750  $\mu\text{L}$ ) umieściłem w U-kształtnej celce pomiarowej. Zmierzona przewodność właściwa roztworu mikrokompozytów p(NIPA-BIS)/PANI wynosiła  $0.5 \text{ mS cm}^{-1}$  w 25°C i była o rząd wielkości większa niż przewodność niezmodyfikowanego mikrożelu p(NIPA-BIS). Ponadto zauważyłem, że przewodność mikrokompozytów nieznacznie wzrosła wraz ze wzrostem temperatury i wynosiła ok.  $0.6 \text{ mS cm}^{-1}$  w 40°C.

Następnie, za pomocą woltamperometrii cyklicznej, zbadalem właściwości elektrochemiczne otrzymanych obiektów. W tym celu porcję wodnej zawiesiny otrzymanych obiektów (mikrożelu lub mikrokompozytu) umieściłem w roztworze kwasu  $\text{HClO}_4$  (0.1 M). Końcowe stężenie mikrożelu lub mikrokompozytu wynosiło ok.  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ . Następnie rejestrowałem woltamperogramy cykliczne (patrz rysunki 45 i 46) w zakresie potencjału 0.3 – 0.9 V oraz w zakresie temperatur 25 – 45°C z szybkością zmian potencjału  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ . Jako elektrolit podstawowy użyłem 0.1 M  $\text{HClO}_4$ , ponieważ jedynie w środowisku kwaśnym polianilina daje sygnały.

Na woltamperogramach uzyskanych dla mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI można zauważyć sygnały typowe dla PANI [325]. Woltamperogramy cykliczne przedstawiają dwie pary pików: jedną przy ok. 0.2 V oraz drugą przy ok. 0.6 V. Pierwsza para pików odpowiada odwracalnej przemianie amina – kationorodnik (chinon) – amina. Druga para odpowiada przemianie kationorodnik – całkowicie utleniona forma polianiliny (chinonodiamina) – kationorodnik [326]. Innymi słowy: pierwsza para pików odpowiada przekształceniu leukoemeraldyny w emeraldynę i odwrotnie (utlenianie/redukcja), natomiast druga para odpowiada utlenianiu/redukcji pary emeraldyna/pernigranilina. Wielkość sygnałów woltamperometrycznych silnie zależała od stopnia spęczenia mikrożelu. Na rysunku 45A przedstawiłem woltamperogramy otrzymane dla mikrokompozytu o różnym stopniu spęczenia (różne temperatury) w środowisku wodnym zawierającym 0.1 M  $\text{HClO}_4$ , tak więc, jonami biorącymi udział w elektROUTLENIANIU/ELEKTROREDUKCJI PANI, były jony  $\text{H}^+$  i  $\text{ClO}_4^-$ . Stopień spęczenia mikrożelu p(NIPA-BIS)/PANI kontrolowałem poprzez odpowiednie ustawienie temperatury.

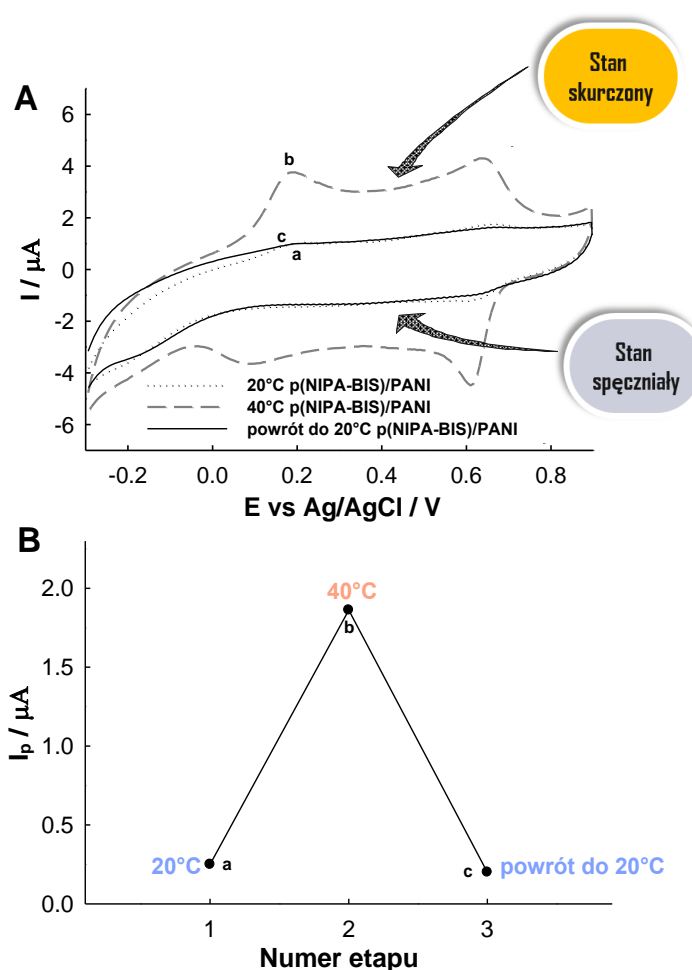


**Rysunek 45.** (A) woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrody złotej zanurzonej w roztworze mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI w różnych temperaturach. (B) zależność prądu piku anodowego (pik przy 0.2 V) od temperatury. Stężenie mikrożelu: ok. 8 mg mL<sup>-1</sup>. Elektrolit podstawowy: 0.1 M HClO<sub>4</sub>;  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

W najbardziej spęczniałym stanie (20°C) sygnały pochodzące od polianiliny były słabo widoczne. Wzrost sygnałów nastąpił wraz z postępem procesu kurczenia żelu. W stanie całkowicie skurczonym, czyli w temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego (35, 40 oraz 45°C), sygnały stały się największe. Na podstawie woltamperogramów cyklicznych zanotowałem dziesięciokrotny wzrost prądu spowodowany procesem kurczenia. Tymczasem, wyliczony na podstawie równania Einsteina oraz równania Randlesa-Sevcika ( $I_p \sim D^{\frac{1}{2}}$ ) wzrost prądu spowodowany tylko kurczeniem się cząstek żelu (wiedząc, że rozmiar kompozytu w temperaturze 20°C wynosił ok. 1700 nm, natomiast w 40°C wynosi ok. 700 nm) powinien być 1.6-krotny. Znaczący to, że duży wzrost prądu spowodowany był elektroaktywnością polianiliny w skurczonym żelu. Zmiany prądu piku względem temperatury przedstawiłem na rysunku 45B. Największy przyrost prądu można zaobserwować w zakresie temperatur,

w którym miało miejsce przejście fazowe, czyli pomiędzy 30 a 35°C. W zakresie temperatur 35 – 45°C wartość prądu nie zmieniała się istotnie.

Otrzymane wyniki pokazują, że proces kurczenia się żelu znacząco zwiększał odpowiedź woltamperometryczną. Takie zachowanie można wytłumaczyć faktem, że lepszy stał się kontakt pomiędzy cząstkami PANI a powierzchnią elektrody, co mogło mieć wpływ na poprawę przeskoku elektronu. Innymi słowy objętościowe przejście fazowe prowadziło do zagęszczenia włókien PANI w każdej cząstce mikrokompozytu. Ponadto, powrót do warunków początkowych poprzedzających przejście fazowe w pełni przywracał odpowiedź woltamperometryczną (patrz rysunek 46A i B).



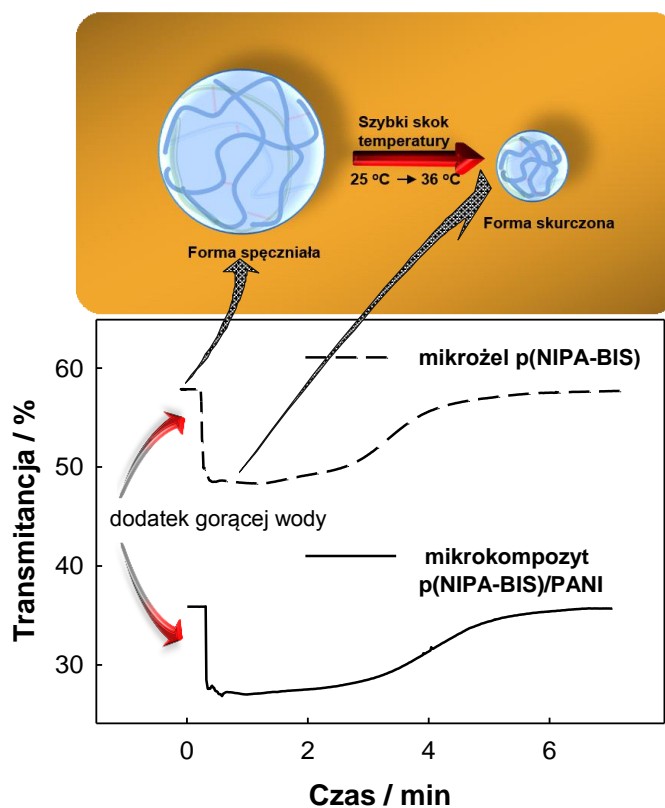
**Rysunek 46.** (A) woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrody złotej zanurzonej w roztworze mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI dla wybranych temperatur: 20°C (stan spęczniały, linia ciągła), 40°C (stan skurczony, linia przerywana) oraz 20°C (powrót do stanu spęczniałego, linia kropkowana). (B) prądy pikowe anodowe (pik przy 0.2 V) dla kompozytu p(NIPA-BIS)/PANI w stanie spęczniałym (a), stanie skurczonym (b) oraz po powrocie do stanu spęczniałego (c). Stężenie mikrożelu ok. 8 mg mL<sup>-1</sup>. Elektrolit podstawowy: 0.1 M HClO<sub>4</sub>;  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Chcę podkreślić, że wiadomo jest, że elektroaktywność PANI nie zmienia się w stosowanym przeze mnie zakresie temperatur. Wpływ na elektroaktywność PANI mają temperatury dopiero powyżej 75°C [327]. Powyżej tej temperatury prądy utleniania/redukcji polianiliny maleją.

Mikrokompozyt p(NIPA-BIS)/PANI nie agregował w warunkach, jakie panowały podczas pomiarów woltamperometrycznych, tj. w 0.1 M HClO<sub>4</sub>. Natomiast zaobserwowałem, że rozmiary kompozytu p(NIPA-BIS)/PANI przed oraz po objętościowym przejściu fazowym uległy zmniejszeniu w obecności kwasu nadchlorowego. Ponadto temperatura przejścia fazowego zmniejszyła się o 1 – 2°C. Takie zachowanie jest typowe dla niezmodyfikowanych mikrożeli p(NIPA-BIS) [193].

#### 10.4. Szybkość przejścia fazowego mikrokompozytu

W celu zbadania szybkości objętościowego przejścia fazowego mikrożelu oraz mikrokompozytu, dokonałem pomiaru zmian transmitancji zawiesiny badanych cząstek w wodzie, w czasie przejścia fazowego. Wyniki przedstawiłem na rysunku 47.



**Rysunek 47.** Wykresy zależności transmitancji od czasu dla zawiesin mikrokompozytu oraz mikrożelu zarejestrowane przy długości fali 550 nm. Wykresy odzwierciedlają kinetykę kurczenia mikroobiektów wywołanego dodatkiem gorącej wody.

Pomiary transmitancji wodnej zawiesiny mikrokompozytów oraz mikrożeli wykonałem przy długości fali 550 nm. Ta długość fali jest zazwyczaj stosowana przy określaniu przejścia fazowego mikrożeli. Względnie szybki wzrost temperatury dwóch mililitrów rozcieńczonych zawiesin mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI i mikrożelu p(NIPA-BIS) o temperaturze 20°C uzyskałem poprzez dodatek gorącej wody destylowanej (1 mL, ok. 60°C). Po dodatku temperatura zawiesin wynosiła ok. 36°C.

Na rysunku tym można zauważyć, że natychmiast po wstrzyknięciu gorącej wody transmitancja obydwu badanych układów mikrocząstek spadała. Po samoczynnym schłodzeniu układów do temperatury początkowej (naturalnie zajmuje to dużo więcej czasu niż wzrost temperatury) transmitancja nieznacznie wzrosła powyżej jej wartości początkowej, ponieważ zawiesiny zostały rozcieńczone. Oszacowałem, że całkowity czas przejścia fazowego (kurczenie) zarówno dla mikrożelu, jak i mikrokompozytu, wynosił około 0.7 s. Jest to dużo mniejsza wartość w porównaniu do żeli o rozmiarach mm – cm.

## 10.5. Podsumowanie

Wykorzystując, opracowaną wcześniej w naszym zespole, tzw. polimeryzację międzyfazową [200] otrzymałem kompozytowy mikrożel na bazie poli(*N*-izopropylloakryloamidu) (NIPA) i polianiliny (PANI). Kombinacja/połączenie termo-czułego mikrożelu i polianiliny doprowadziła do uzyskania materiału, który wykazywał właściwości charakterystyczne dla obu komponentów. Badania z użyciem SEM oraz TEM dowiodły, że mikrokompozyt tworzył sferyczne cząstki, posiadające kalafiorowatą oraz chropowatą strukturę, o równomiernie rozłożonych w całej objętości mikrożeli nanowłóknach polianiliny. Mikrokompozyt wykazywał szybkie (< 0.7 s) oraz odwracalne przejście fazowe, wywołane zmianą temperatury. Zbliżona do czystego mikrożelu p(NIPA-BIS) temperatura przejścia fazowego mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI świadczy, że PANI nie była związana chemicznie z siecią polimerową mikrożelu, lecz oddziaływała z nią fizycznie. Kurczenie się kompozytu pod wpływem wzrostu temperatury znacznie zwiększało sygnał woltamperometryczny, pochodzący od polianiliny. Równolegle jego przewodnictwo było o rząd wielkości większe niż przewodnictwo niezmodyfikowanego mikrożelu p(NIPA-BIS). Ewidentnie

skurczenie mikrokompozytu poprawiało kontakt między włóknami polianiliny i większa ilość polianiliny była w kontakcie z powierzchnią elektrody. Powyższe właściwość czynią mikrokompozyt interesującym materiałem do np. wytwarzania przełączalnych systemów elektrochemicznych oraz sensorów.





## 11. Mikrożel pNIPA zawierający mostki disiarczkowe jako nośnik leku

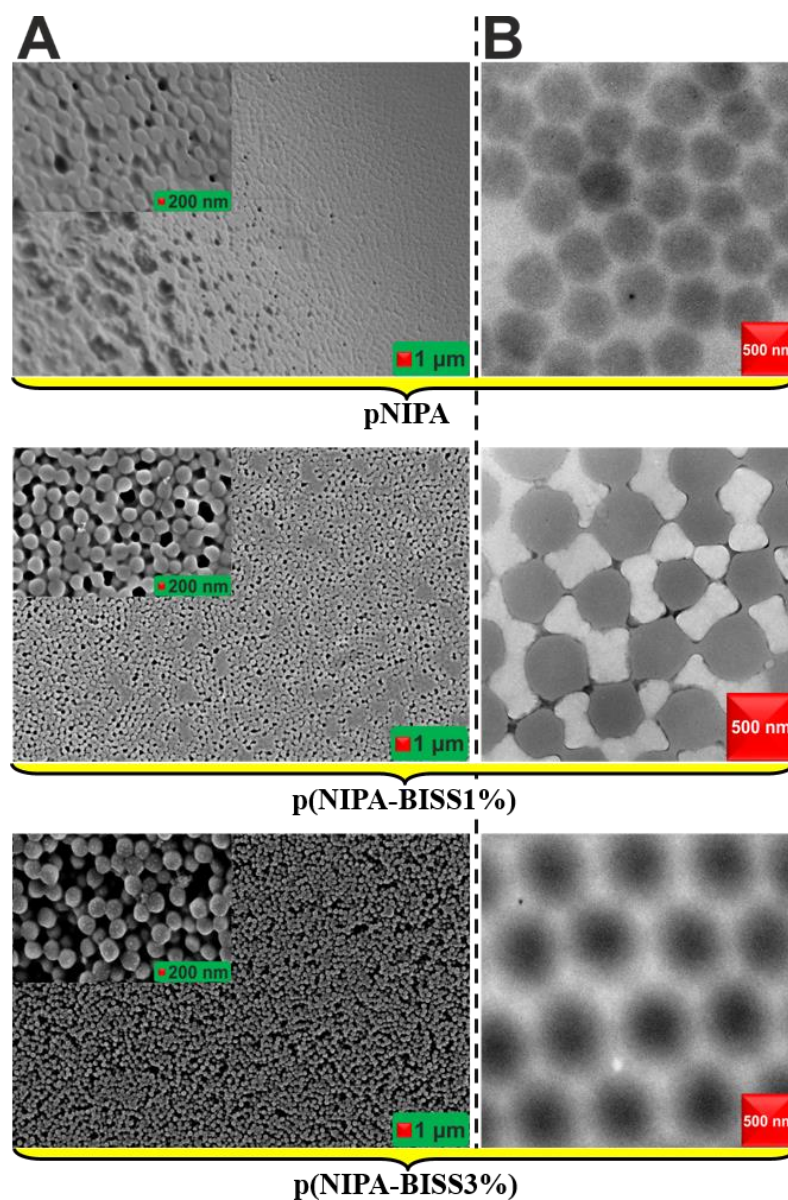
Mikrożele na bazie polimeru pNIPA znajdują zastosowanie w systemach dostarczania leków. Istnieje jednak kilka ograniczeń w użyciu poli(NIPA) jako nośnika leków: jego cytotoksyczność oraz niedegradowalność. Na szczęście mikrożele pNIPA o stężeniu mniejszym niż  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  nie wykazują cytotoksyczności. Dlatego mikrożele pNIPA o stężeniu  $< 1 \text{ mg mL}^{-1}$  są coraz częściej stosowane w medycynie. Niedegradowalność hydrożeli pNIPA wynika z tego, że sieć żelu zbudowana jest z niedegradowalnego czynnika sieciującego. Najczęściej jest nim *N,N'*-metylenobisakryloamid.

Próbując zmniejszyć cytotoksyczność mikrożeli na bazie pNIPA oraz nadać im degradowalność, do usieciowania polimeru pNIPA użyłem czynnika sieciującego zawierającego mostki disiarczkowe. Modyfikując aminokwas L-cystynę poprzez wprowadzenie do struktury cząsteczki aminokwasu dwóch grup akrylowych (patrz rysunek 30), zsyntezowałem czynnik sieciujący *N,N'*-bis(akryloilo)cystynę (BISS). Kopolimeryzując czynnik sieciujący (BISS) z *N*-izopropylakryloamidem otrzymałem nowy środowiskowo-czuły, stabilny w warunkach fizjologicznych oraz zdolny do degradacji mikrożel p(NIPA-BISS) (patrz rysunek 31). W otrzymanym mikrożelu p(NIPA-BISS) polimer pNIPA nadawał mikrożelowi czułość na temperaturę, natomiast obecne w czynniku sieciującym mostki disiarczkowe oraz grupy karboksylowe odpowiedzialne były za nadanie mikrożelowi odpowiednio degradowalności oraz czułości na zmiany pH (kontrola ilości ujemnych ładunków w sieci polimerowej mikrożelu poprzez zmianę pH). Obecność grup karboksylowych w mikrożelu dodatkowo nadawała mikrożelowi stabilność w roztworach o dużej mocy jonowej. Ponadto obecność grup karboksylowych w mikrożelu pozwoliła na związanie z nim leku przeciwnowotworowego doksorubicyny (DOX) za pomocą oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy grupami aminokwasowymi leku a zjonizowanymi grupami karboksylowymi BISS. Poprzez zrywanie mostków disiarczkowych, obecnych w sieci polimerowej mikrożelu, za pomocą reduktorów możliwa była degradacja mikrożelu, a następnie uwolnienie umieszczonego w mikrożelu leku.

Używając techniki DLS zbadalem wpływ zmian temperatury (w zakresie 23 – 43°C), pH (1.5 – 12), oraz siły jonowej (0.001 – 1.5 M NaCl) na zmiany rozmiarów/stopnia spęczenia oraz stabilność mikrożeli o różnej zawartości czynnika sieciującego. Określiłem wpływ zawartości pochodnej cystyny (0 – 3%) na zachowanie się mikrożeli, tj. stopień spęczenia oraz temperaturę przejścia fazowego. Morfologię mikrożeli zbadalem za pomocą skaningowego i transmisyjnego mikroskopu elektronowego (SEM i TEM). Za pomocą mikroskopii elektronowej SEM i TEM zbadalem także wpływ dwóch reduktorów mostków disiarczkowych, ditiotritolu (DTT) oraz glutationu (GSH), o stężeniu 0.01 M na degradację otrzymanych mikrożeli. Zbadalem także uwalnianie leku z mikrożeli w warunkach, jakie panują w komórkach zdrowych: pH ~ 7.4,  $C_{\text{GSH}} \sim 10$  mM, oraz w warunkach, jakie panują w komórkach nowotworowych: pH ~ 5.0,  $C_{\text{GSH}} > 10$  mM (faktycznie nie przekraczałem stężenia 10 mM). Następnie zbadalem przydatność mikrożeli jako nośnika leku, doksorubicyny, prosząc o wykonanie odpowiednich testów cytotoxyczności.

### 11.1. Morfologia mikrożeli

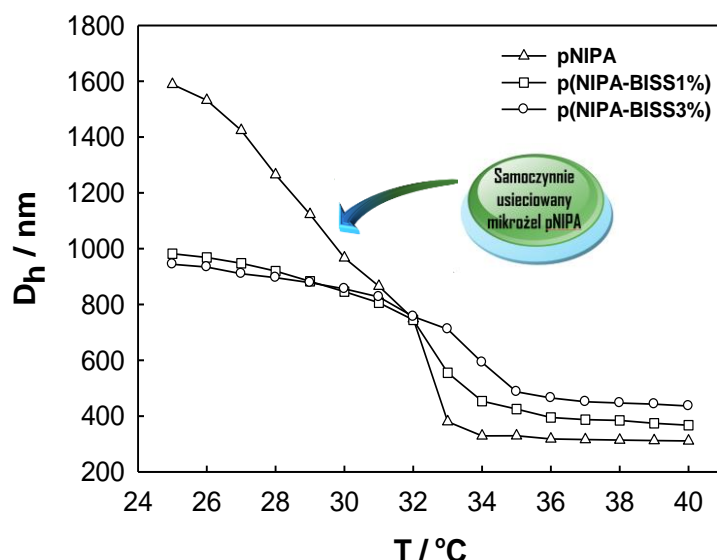
Morfologię mikrożeli p(NIPA-BISS), zawierających różną zawartość aminokwasu, zbadalem przy użyciu mikroskopii elektronowej. Wybrane zdjęcia SEM i TEM mikrożeli, zawierających różną ilość BISS, przedstawiłem na rysunku 48. Wszystkie zsyntezowane mikrożele miały kształt sferyczny. Jednak w przypadku samoczynnie usieciowanego mikrożelu pNIPA, bez udziału czynnika sieciującego, sferyczny kształt cząstek był nieco zdeformowany. Prawdopodobnie dlatego, że nieusieciowany mikrożel powstaje na skutek fizycznego splątania się łańcuchów polimerowych podczas syntezy (patrz rozdział 4.3, „Synteza mikrożeli”). Wszystkie otrzymane mikrożele cechowały się wysoką monodispersyjnością i gładką powierzchnią, w szczególności mikrożel z największą ilością czynnika sieciującego, tj. p(NIPA-BISS3%). Warto nadmienić, że uporządkowane rozmieszczenie cząstek mikrożeli z 3% zawartością BISS oraz wąski rozkład rozmiarów cząstek mikrożeli był wynikiem sił odpychających, obecnych pomiędzy dużą ilością ujemnie naładowanych grup karboksylowych w mikrożelu p(NIPA-BISS3%). Analiza zdjęć SEM i TEM pozwoliła także stwierdzić, że rozmiar mikrożeli zwiększał się wraz ze wzrostem zawartości BISS.



**Rysunek 48.** Zdjęcia SEM (A) oraz TEM (B) mikrożeli o różnej zawartości BISS.

## 11.2. Wpływ zawartości *N,N'*-bis(akryloilo)cystyny na stopień napężnienia mikrożeli

Wpływ temperatury na stopień spęcznienia mikrożeli, zawierających różną ilość aminokwasu, zbadalem za pomocą techniki DLS i przedstawiłem w postaci zmian średnicy hydrodynamicznej mikrożeli w funkcji temperatury na rysunku 49.



**Rysunek 49.** Wykres przedstawiający zmiany średnicy hydrodynamicznej mikrożeli o różnej zawartości BISS w funkcji temperatury.

Porównując rozmiary mikrożeli w stanie skurczonym, zmierzone techniką DLS, z rozmiarami wysuszonych mikrożeli, zmierzonymi na podstawie zdjęć SEM i TEM, można zauważyć, że rozmiary te odpowiadają sobie. Natomiast analizując dane na rysunku 49 można stwierdzić, że wzrost ilości aminokwasu w sieci polimerowej mikrożeli prowadził do:

1. Zmniejszenia rozmiarów mikrożeli w temperaturach niższych niż temperatura objętościowego przejścia fazowego danego mikrożelu (np. w temperaturze 25°C  $D_h$  wynosiło 1589, 982 oraz 943 nm, odpowiednio dla samoczynnie usieciowanego mikrożelu pNIPA, p(NIPA-BISS1%) i p(NIPA-BISS3%)). Zmniejszenie rozmiarów mikrożeli (mniejsza ilość wchłoniętego rozpuszczalnika) prawdopodobnie spowodowane było tym, że zwiększenie gęstości usieciowania prowadziło do bardziej upakowanej struktury. Z kolei w mniejszym stopniu usieciowana struktura mogła wchłonąć więcej rozpuszczalnika i bardziej napęcznieć. Samoczynnie usieciowane mikrożele pNIPA, otrzymane bez udziału czynnika sieciującego, powstają na skutek splątowania łańcuchów polimerowych oraz reakcji przeniesienia łańcucha. Reakcje przeniesienia łańcucha są rzadkie, dlatego mikrożele te mają niezwykle niski stopień usieciowania, więc chłoną więcej rozpuszczalnika i bardziej pęcznieją niż mikrożele usieciowane.

2. Wzrostu rozmiarów mikrożeli w temperaturach wyższych niż VPTT (np. w temperaturze 40°C  $D_h$  wynosiło 311, 367 i 436 nm odpowiednio dla pNIPA, p(NIPA-BISS1%) oraz p(NIPA-BISS3%)). Wzrost zawartości czynnika sieciującego w mikrożelu prowadził do zmniejszenia ilości wody absorbowanej przez żel i czynił sieć polimerową żelu bardziej oporną na całkowite skurczenie w temperaturach powyżej VPTT. Takie działanie czynnika sieciującego zostało już opisane w literaturze [81,107].
3. Wzrostu temperatury objętościowego przejścia fazowego. Z literatury wiadomo, że obecność grup hydrofilowych w sieci polimerowej mikrożeli powoduje wzrost VPTT, podczas gdy grupy hydrofobowe dają efekt odwrotny [328]. Dlatego też mikrożel p(NIPA-BISS3%) wykazywał najwyższą z syntezowanych mikrożeli temperaturę VPTT, tj. ok. 34°C. Niezmodyfikowany, samoczynnie usieciowany mikrożel pNIPA wykazywał temperaturę VPTT zgodną z literaturową temperaturą przejścia fazowego usieciowanych mikrożeli na bazie pNIPA, tj. ok. 32°C [100].

### **11.3. Wpływ siły jonowej na stopień napężnienia oraz stabilność mikrożeli**

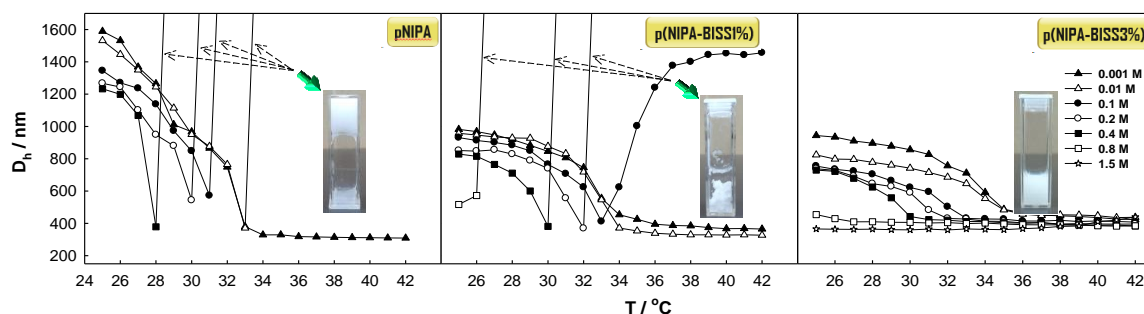
Stabilność mikrożeli zależy głównie od ich ładunku powierzchniowego. Im większym ładunkiem (dodatnim lub ujemnym) obdarzone są cząstki mikrożeli, tym większa jest ich stabilność w roztworach o dużej mocy jonowej. Cząstki obdarzone niewielkim ładunkiem są niestabilne i w konsekwencji nie są dobrze zdyspergowane w ośrodku. Stabilność mikrożeli można przewidzieć z ich potencjału Zeta. Cząstki o dużym ujemnym bądź dodatnim potencjale Zeta odpychają się, więc są stabilne i nie agregują. Potencjały Zeta, otrzymane dla wodnej zawiesiny mikrożeli o różnej zawartości BISS, przy użyciu techniki DLS, przedstawiłem w tabeli 4. Wzrost ujemnej wartości potencjału Zeta wraz ze wzrostem ilości czynnika sieciującego w sieci mikrożeli, spowodowany był tym, że im więcej czynnika sieciującego w mikrożelu, tym większy ładunek ujemny zostaje wprowadzony do sieci polimerowej [328]. Ujemny ładunek pochodził od zjonizowanych grup karboksylowych, obecnych obok mostków

disiarczkowych w czynniku sieciującym. Największy ujemny potencjał Zeta, i tym samym największą stabilność, posiadał mikrożel p(NIPA-BISS3%).

	p(NIPA)	p(NIPA-BISS1%)	p(NIPA-BISS3%)
Potencjał zeta / mV	- 0.853	- 2.990	- 8.900

**Tabela 4.** Potencjał Zeta zmierzony dla wodnej zawiesiny mikrożeli o różnej zawartości BISS.

W celu zbadania stabilności mikrożeli w roztworach o różnej mocy jonowej, oczyszczone za pomocą dializy mikrożele p(NIPA-BISS) odwirowałem (14000 rpm, 30 min. 10°C) i nasączyłem roztworem wodnym o wybranym stężeniu soli NaCl. Następnie wykonałem pomiary średnicy hydrodynamicznej mikrożeli w funkcji temperatury. Wyniki przedstawiłem na rysunku 50.



**Rysunek 50.** Wykresy zależności średnicy hydrodynamicznej od temperatury, otrzymane dla mikrożeli o różnej zawartości BISS, zawieszonych w roztworach o różnym stężeniu soli (NaCl). Zdjęcia przedstawiają żelowany mikrożel pNIPA, sflokulowany mikrożel p(NIPA-BISS1%) z powodu wysokiego stężenia soli oraz stabilny roztwór koloidalny mikrożelu p(NIPA-BISS3%).

Mikrożel pNIPA bez czynnika sieciującego tracił swoją stabilność – agregował a następnie żelował przy wzroście temperatury już przy niskiej sile jonowej – 0.01 M (patrz zdjęcie w lewej części rysunku 50). Temperatura, przy której mikrożel zaczynał być niestabilny, zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia soli. Za brak stabilności mikrożelu w roztworze o tak małej mocy jonowej odpowiedzialny był zbyt mały ładunek powierzchniowy mikrożelu (– 0.893 mV), pochodzący jedynie od reszty siarczanowej inicjatora obecnego w czasie syntezy mikrożelu. Obecność jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  powodowała zrywanie wiązań wodorowych i dehydratację mikrożelu. Następowo jego kurczenie oraz zaburzony był rozkład ładunku ujemnego na mikrożelu; ostatecznie

doprowadzało to do agregacji cząstek i żelowania. Flokulacja pojawiała się dopiero, gdy stężenie elektrolitu było wystarczająco wysokie, aby osłabić siły elektrostatycznego odpychania pomiędzy cząstkami mikrożeli, oraz gdy mikrożele występowały w stanie skurczonym [192]. Temperatura, przy której mikrożel pNIPA tracił swoją stabilność i flokulował, zmniejszała się wraz ze wzrostem mocy jonowej, ponieważ większe stężenie soli powodowało, że coraz więcej wiązań wodorowych ulegało zerwaniu, toteż coraz niższa temperatura była potrzebna do wywołania przejścia fazowego mikrożelu. Mikrożele stały się bardziej odporne na proces flokulacji, gdy posiadały więcej zjonizowanych grup, czyli gdy obdarzone były większym ładunkiem ujemnym. Wzrost zawartości BISS powodował wzrost zawartości ujemnie naładowanych grup karboksylowych w mikrożelu, czemu odpowiadał bardziej ujemny potencjał Zeta. Zatem obecność BISS w sieci polimerowej badanych mikrożeli nadała im lepszą stabilność w obecności soli.

W przypadku mikrożelu p(NIPA-BISS1%), z powodu większej zawartości grup karboksylowych, pochodzących od czynnika sieciującego, potrzebne było większe stężenie soli, które by spowodowało spadek stabilności mikrożeli. Większa ilość grup karboksylowych sieci skutkowała większym ładunkiem powierzchniowym mikrożelu ( $-2.173$  mV). Dlatego też mikrożel p(NIPA-BISS1%) zaczynał agregować wraz ze wzrostem temperatury w wyższych niż dla mikrożelu pNIPA stężeniach soli. Mikrożel p(NIPA-BISS1%) był stabilny w roztworach o stężeniu NaCl mniejszym niż  $0.1$  M. Już w roztworze soli o stężeniu  $0.1$  M mikrożel zaczynał być niestabilny, a jego rozmiar znacznie wzrastał ze wzrostem temperatury. Całkowita agregacja mikrożelu p(NIPA-BISS1%) była zauważalna gołym okiem w roztworach o mocy jonowej  $0.2$  M (patrz zdjęcie w centralnej części rysunku 50).

Największą stabilność w roztworach o dużej mocy jonowej wykazywał mikrożel p(NIPA-BISS3%). Wraz ze wzrostem stężenia soli obserwowałem zmniejszenie temperatury objętościowego przejścia fazowego mikrożeli. Natomiast dla bardzo wysokich stężeń soli ( $0.8$  oraz  $1.5$  M) mikrożel p(NIPA-BISS3%) tracił wrażliwość na temperaturę i występował w formie skurczonej we wszystkich stosowanych temperaturach. Jednak nawet przy tak dużych stężeniach soli, mikrożel nie tracił swojej stabilności, ze względu na wyższą niż w przypadku poprzednich mikrożeli zawartość grup karboksylowych i tym samym wyższy ładunek powierzchniowy ( $-7.18$  mV).

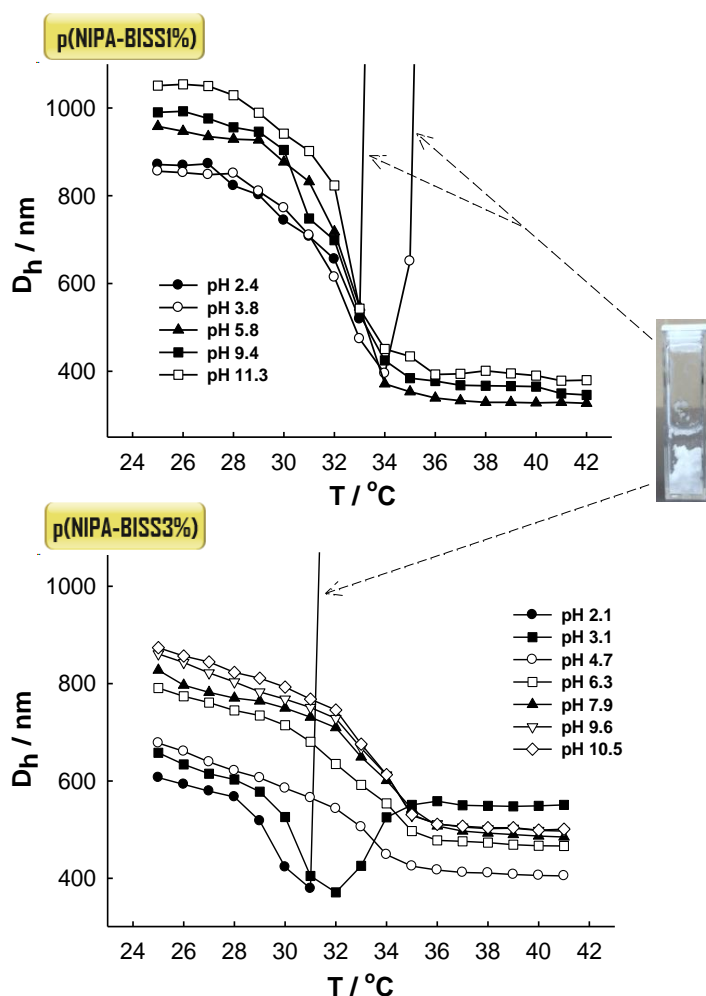
Wzrost zawartości BISS powodował wzrost ujemnie naładowanych grup karboksylowych, dlatego też obecność diakrylowej pochodnej cystyny, jako czynnika sieciującego, oprócz degradowalności i czułości na pH dodawała mikrożelom większej stabilności w roztworach o wysokiej mocy jonowej. Stężenie soli w ludzkim organizmie wynosi ok 0.15 M, w związku z czym zwykły, niezmodyfikowany mikrożel w tak wysokim stężeniu elektrolitu traciłby swoją stabilność.

#### **11.4. Wpływ pH na stopień napęczenia mikrożeli**

W celu zbadania wpływu pH na stopień spęczenia i stabilność mikrożeli, oczyszczone za pomocą dializy mikrożele p(NIPA-BISS) odwirowałem (14000 rpm, 30 min. 10°C) i po usunięciu supernatanta nasączyłem je roztworem o różnym pH; pH zmieniałem poprzez dodawanie HCl albo NaOH. Końcową wartość pH mierzyłem tuż przed pomiarami. Aby zbadać jedynie wpływ pH na rozmiary i przejście fazowe mikrożeli, siłę jonową utrzymałem na stałym poziomie 0.01 M, dodając do zawiesiny mikrożeli odpowiednią ilość NaCl. Wpływ temperatury na stopień spęczenia mikrożeli z różną zawartością BISS zbadłem w kilku wybranych wartościach pH i przedstawiłem na rysunku 51.

W przypadku mikrożelu p(NIPA-BISS1%) zmiany stopnia spęczenia wywołane zmianą pH były niewielkie ze względu na niską zawartość BISS (grup karboksylowych). Jedynie w skrajnych wartościach pH oraz w temperaturach przed przejściem fazowym można było zauważyć niewielkie różnice w rozmiarze cząstek. W alkalicznym pH oraz w temperaturach poniżej temperatury przejścia fazowego mikrożele miały większe rozmiary niż w kwaśnym pH. Natomiast dla  $\text{pH} \leq 3.8$  mikrożele agregowały wraz ze wzrostem temperatury (patrz zdjęcie na rysunku 51). Natomiast temperatura objętościowego przejścia fazowego mikrożelu nie ulegała zmianie pod wpływem zmian pH.





**Rysunek 51.** Wykres zależności średnicy hydrodynamicznej mikrożeli p(NIPA-BISS1%) oraz p(NIPA-BISS3%) w funkcji temperatury oraz pH. Zdjęcie przedstawia skutek flokulacji mikrożeli w kwaśnym pH.

Największe zmiany rozmiarów oraz temperatury VPTT, wywołane zmianą pH, obserwowałem dla mikrożeli p(NIPA-BISS3%). W alkalicznym pH mikrożele posiadały większy rozmiar, zarówno przed – jak i po – przejściu fazowym. W takich warunkach prawie wszystkie grupy karboksylowe, obecne w sieci polimerowej mikrożeli, były zjonizowane i mikrożele pęczniały. Pęcznienie to wywołane było elektrostatycznym odpychaniem ujemnie naładowanych grup karboksylowych oraz wzrostem ciśnienia osmotycznego pomiędzy roztworem a mikrozelem. Ponadto w alkalicznym pH mikrożele nie kurczyły się całkowicie, a ich temperatura VPTT była większa niż w pH kwaśnym. Zjawisko to prawdopodobnie spowodowane było tym, że siły elektrostatycznego odpychania (pomiędzy zjonizowanymi grupami

karboksylowymi) utrudniały proces całkowitego skurczenia mikrożeli; potrzebna była wyższa temperatura do wywołania przejścia fazowego mikrożeli.

Wraz ze wzrostem zakwaszenia mikrożeli i spadkiem wartości pH średnica mikrożeli uległa zmniejszeniu, zarówno przed – jak i po – przejściu fazowym, z powodu protonowania grup karboksylowych. Dalsze zakwaszanie roztworu skutkowało zachowaniem się mikrożeli, podobnym do obserwowanego dla zbyt dużej siły jonowej. Z powodu protonowania grup karboksylowych i w związku z tym – mniejszego ładunku ujemnego – mikrożele traciły swoją stabilność i agregowały ze wzrostem temperatury. Mikrożele o mniejszym ładunku powierzchniowym miały większą tendencję do agregacji w kwaśnych warunkach aniżeli mikrożele o większym ładunku powierzchniowym. Mikrożel p(NIPA-BISS1%) flokulował już w pH ok. 4, podczas gdy mikrożel p(NIPA-BISS3%) zaczynał być niestabilny w pH ok. 3, natomiast agregował całkowicie dopiero przy wartości pH ok. 2 (patrz zdjęcie na rysunku 51).

Wykonałem także kilka eksperymentów dla mikrożelu samoczynnie usieciowanego (pNIPA) w różnych wartościach pH (2.7 – 11.6) przy stałej sile jonowej (0.01 M NaCl). We wszystkich zadanych wartościach pH mikrożel pNIPA tracił swoją stabilność i agregował w temperaturach powyżej 33°C. Natomiast rozmiar mikrocząstek żelu poniżej temperatury przejścia fazowego był praktycznie niezależny od pH.

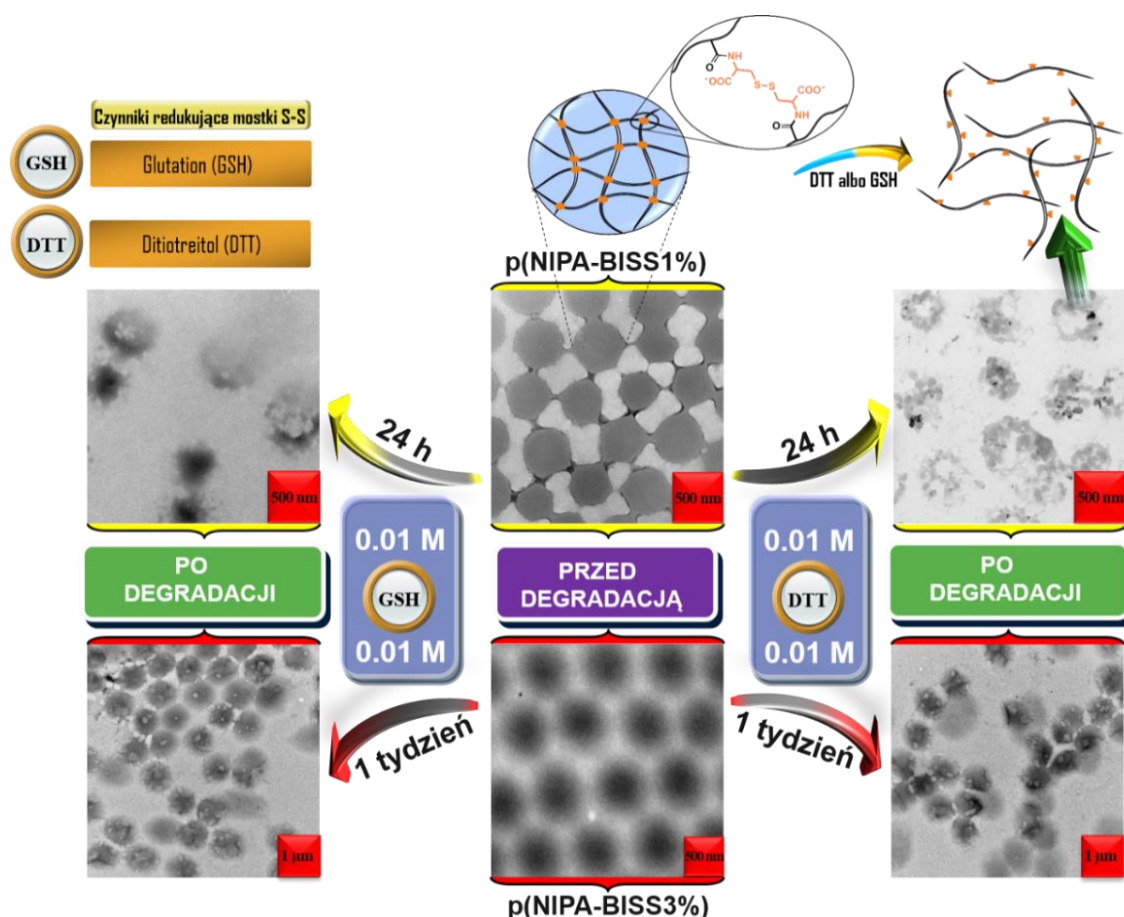
## 11.5. Degradacja mikrożeli

Degradacja mikrożeli usieciowanych za pomocą pochodnej cystyny możliwa była poprzez zrywanie/redukcję mostków disiarczkowych za pomocą reduktora. W biochemii jako czynniki redukujące disiarczki stosowane są tiole, takie jak: ditiotreitol (DTT) oraz merkaptioetanol. DTT jest wystarczająco silnym reduktorem, aby zredukować mostek disiarczkowy. Sam utlenia się do heterocyklicznego pierścienia 1,2-ditianu, zawierającego wewnątrzcząsteczkowy mostek –S–S–. DTT jest bardzo często stosowany do redukcji mostków disiarczkowych białek oraz do zapobiegania tworzeniu się mostków disiarczkowych pomiędzy cząsteczkami cysteiny w białkach.

Jednak z medycznego punktu widzenia korzystne byłoby, aby mostki disiarczkowe były cięte za pomocą występującego w komórkach glutationu (GSH). Glutation (tripeptyd) jest niskocząsteczkowym biologicznym tiolem i z utlenioną jego formą stanowi główną parę redoks w komórkach zwierzęcych [329]. Wiadomym jest, że w komórkach zwierzęcych oraz ludzkich istnieje znacząca różnica potencjału redoks pomiędzy środowiskiem zewnątrzkomórkowym, a środowiskiem panującym wewnątrz komórki [330,331]. W cytoplazmie stężenie glutationu jest ok. 1000 razy większe (0.5 – 10 mM) niż w płynach zewnątrzkomórkowych (ok. 2 – 20  $\mu$ M) [332]. Stężenie glutationu zależy również od rodzaju komórek. Na przykład, w komórkach krwi wynosi  $\sim$  5 mM, zaś w komórkach wątrobowych wynosi  $\sim$  30 mM [333]. Ponadto stwierdzono, że stężenie GSH w komórkach nowotworowych jest ok. 4 razy większe niż w komórkach zdrowych. W swojej pracy badawczej, jako czynników redukujących mostki disiarczkowe użyłem glutationu oraz ditiotreitolu.

W celu zbadania degradacji mikrożeli pod wpływem czynnika redukującego, oczyszczone za pomocą dializy mikrożele p(NIPA-BISS) odwirowałem (14000 rpm, 30 min. 10°C), a roztwór (supernatant) usunąłem. Odwirowane żele nasączyłem wodnym roztworem czynnika redukującego (DTT albo GSH) o stężeniu 0.01 M. Wartość pH utrzymywałem w pobliżu 5.0. Następnie zbadałem próbki za pomocą mikroskopii elektronowej SEM oraz TEM. Zdjęcia otrzymane przy użyciu tych dwóch technik mikroskopowych ujawniły istotne zmiany w morfologii mikrożeli. Na rysunku 52 przedstawiłem wybrane zdjęcia TEM zdegradowanych mikrożeli z różną zawartością BISS.

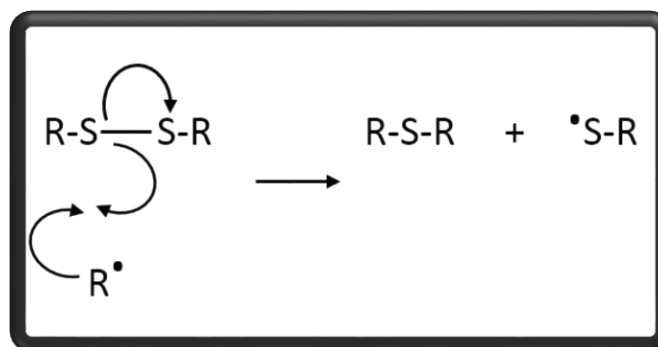
Jak można zauważyć na zdjęciach, struktura sferyczna cząstek obydwu mikrożeli tj. p(NIPA-BISS1%) oraz p(NIPA-BISS3%) uległa zniszczeniu pod wpływem każdego z użytych czynników redukujących. Zdjęcia TEM pokazują, że mikrożele p(NIPA-BISS1%) degradują na mniejsze fragmenty po jednym dniu oddziaływania z czynnikiem redukującym.



**Rysunek 52.** Zdjęcia TEM mikrożeli p(NIPA-BIS1%) oraz p(NIPA-BIS3%) przed, oraz po, degradacji wywołanej redukcją mostków disiarczkowych, za pomocą czynnika redukującego DTT albo GSH.

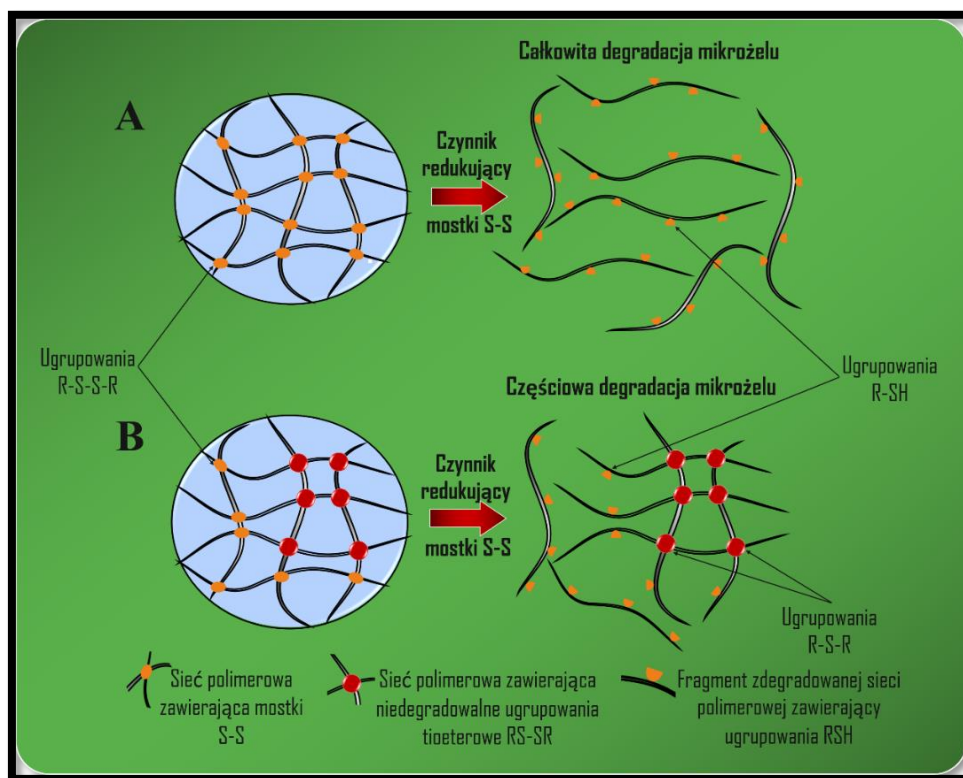
Jednak o ile mikrożel p(NIPA-BISS1%) uległ prawie całkowitej degradacji, to mikrożel p(NIPA-BISS3%) nawet po tygodniowym oddziaływaniu z czynnikiem redukującym degradował niecałkowicie; zniszczeniu uległ jedynie sferyczny kształt mikrożelu. Można wytłumaczyć to tym, że podczas syntezy mikrożelu mają miejsce niepożądane reakcje uboczne, które zrywają wiązania siarka-siarka obecne w BISS.

Wiązanie disiarczkowe może zostać homolitycznie rozszczepione w wysokich temperaturach. W rezultacie, podczas syntezy mogą powstawać rodniki siarczkowe, które biorą udział w tworzeniu tioeterów RSR (sulfidów), niepodatnych na proces redukcji oraz wzmacniających sieć polimerową [334]. W rezultacie, w utworzonym mikrożelu oprócz wiązań R-S-S-R (R – łańcuch polimerowy), które można zredukować i doprowadzić do degradacji mikrożelu, obecne są też wiązania R-S-R odporne na redukcję (patrz rysunek 53):



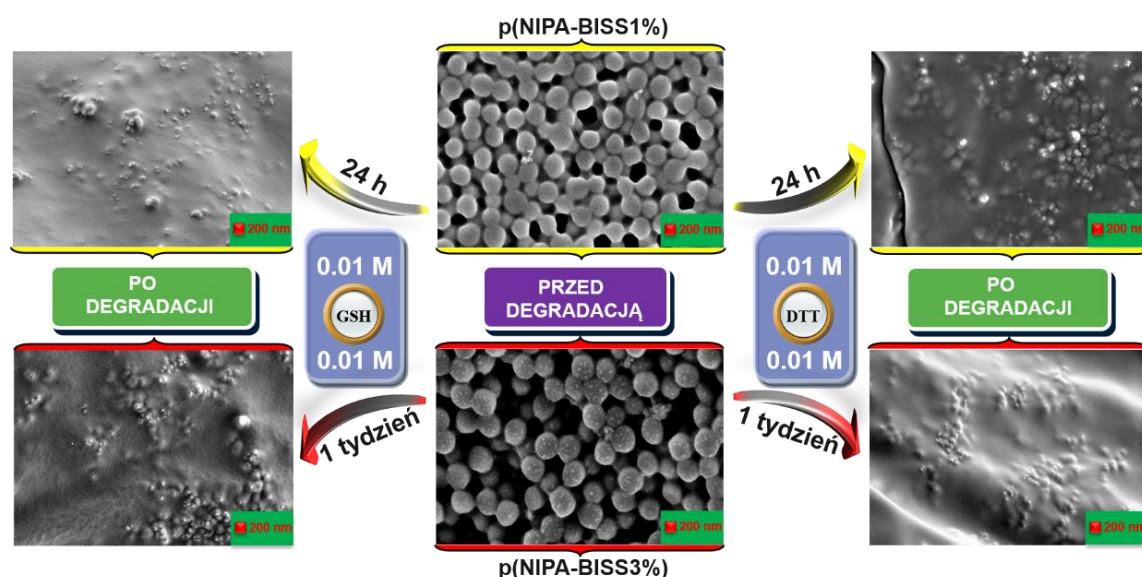
**Rysunek 53.** Możliwa reakcja uboczna, angażująca atak rodnika na wiązanie disiarczkowe, podczas syntezy mikrożeli p(NIPA-BISS), prowadząca do utworzenia niedegradowalnego (odpornego na redukcję) tioeteru.

Prawdopodobnie, to właśnie powstawanie tioeterów RSR odpowiadało za niecałkowitą degradację mikrożeli p(NIPA-BISS3%). Wysoka temperatura (70°C), w której prowadziłem syntezę mikrożeli, była niezbędna do spowodowania termicznego rozpadu inicjatora (SPS). Niestety, temperatura ta sprzyjała zrywaniu mostków disiarczkowych i powstawaniu odpornych na redukcję tioeterów. Częściową oraz całkowitą degradację mikrożeli schematycznie przedstawiłem na rysunku 54.



**Rysunek 54.** Całkowita (A) oraz częściowa (B) degradacja mikrożeli p(NIPA-BIS) zależna od obecności ugrupowań RS–SR (zdolnych do redukcji) oraz RSR (niezdolnych do redukcji).

Degradację mikrożeli udokumentowałem również przy użyciu mikroskopii SEM. Na rysunku 55 przedstawiłem zdjęcia SEM zdegradowanych mikrożeli p(NIPA-BISS1%), po jednym dniu oddziaływania z czynnikiem redukującym (DTT lub GSH) o stężeniu 0.01 M, oraz częściowo zdegradowanych żeli p(NIPA-BISS3%), po tygodniu oddziaływania z danym czynnikiem redukującym mostki disiarczkowe. Na zdjęciach można zauważyć, że każdy z mikrożeli, niezależnie od zastosowanego czynnika redukującego, miał zniszczoną powierzchnię. Ponadto, na każdym ze zdjęć można zauważyć pojedyncze fragmenty lub skupiska zniszczonych mikrożeli.



**Rysunek 55.** Zdjęcia SEM mikrożeli p(NIPA-BIS1%) oraz p(NIPA-BIS3%) przed, oraz po, degradacji wywołanej redukcją mostków disiarczkowych, za pomocą czynnika redukującego DTT albo GSH.

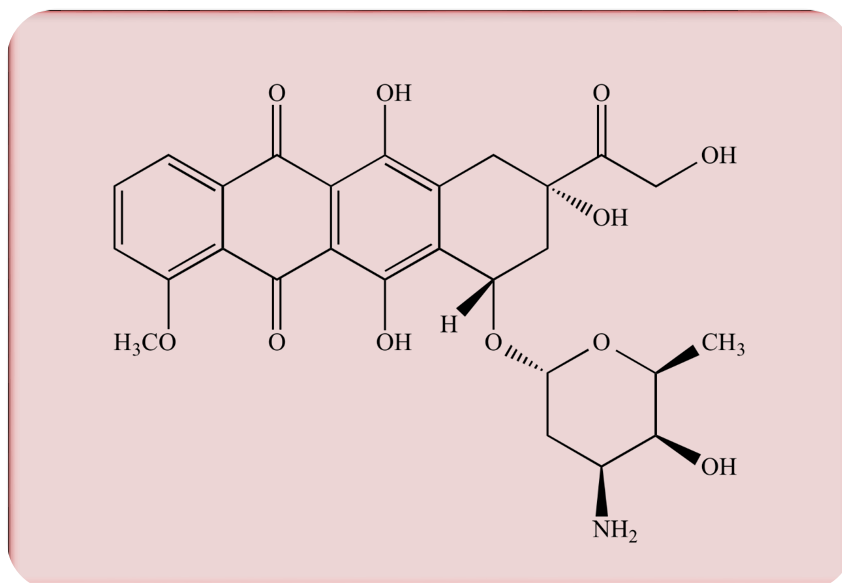
## 11.6. Uwalnianie dokсорubicyny z mikrożelu

Aby ocenić przydatność mikrożeli, usieciowanych za pomocą pochodnej cystyny, jako potencjalnych nośników leków, wybrałem mikrożel p(NIPA-BISS3%) oraz dokсорubicynę jako modelowy lek przeciwnowotworowy. Mikrożel p(NIPA-BISS1%) ulegał prawie całkowitej degradacji w obecności zarówno glutationu, jak i ditiotreitolu o stężeniu 0.01 M. Niestety był niestabilny w warunkach fizjologicznych i agregował, co wykluczyło jego możliwe zastosowanie jako nośnika leku. Natomiast mikrożel p(NIPA-BISS3%) nie degradował całkowicie, ale był stabilny w warunkach fizjologicznych, dlatego też do dalszej charakterystyki wybrałem właśnie ten mikrożel.

W celu zbadania kontrolowanego uwalniania leku z mikrożeli, najpierw musiałem ten lek umieścić w mikrożelu.

### 11.6.1. Umieszczenie doksorubicyny w mikrożelu

Doksorubicyna, popularnie zwana Adriamycyną, jest szeroko stosowanym lekiem przeciwnowotworowym. Lek ten oddziałuje/interkaluje z helisą DNA i jest inhibitorem procesu replikacji DNA [335,336]. Doksorubicyna jest stosowana w leczeniu białaczki oraz raka pęcherza moczowego, piersi, jajników, tarczycy oraz żołądka. Doksorubicyna znana jest z tego, że powoduje szereg efektów ubocznych, takich jak nudności, wymioty, wypadanie włosów, supresja szpiku oraz kardiotoxyczność. Ze względu na powyższe efekty oraz czerwoną barwę doksorubicynę nazywa się „czerwonym diablem”. Biorąc pod uwagę powyższe skutki uboczne bardzo ważne jest, aby odpowiednio ukierunkować, w organizmie, dostarczanie tego leku. Strukturę chemiczną leku przedstawiłem na rysunku 56.

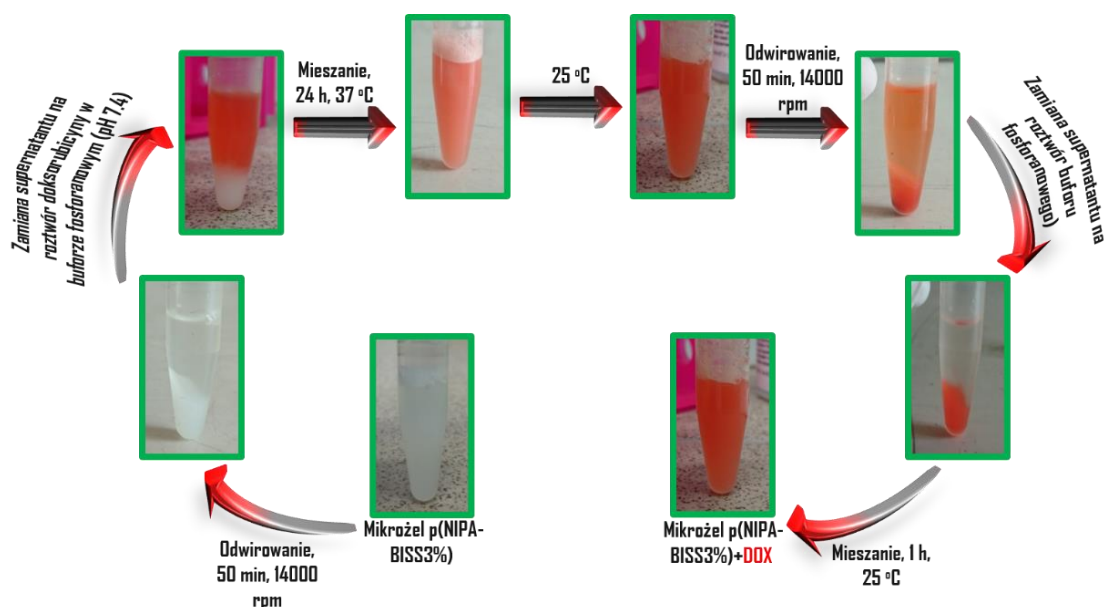


**Rysunek 56.** Wzór chemiczny leku przeciwnowotworowego, doksorubicyny.

DOX jest słabą zasadą,  $pK_a \sim 8.22$ . Dlatego w  $pH = 7.4$  lek naładowany jest dodatnio, co umożliwia wprowadzenie go do wnętrza mikrożelu na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych (mikrożel w  $pH > 5$  miał ładunek ujemny). Doksorubicynę umieściłem w mikrożelu p(NIPA-BISS3%) wykorzystując metodę



inkubacyjną. 1 mL mikrożeli p(NIPA-BISS3%) o stężeniu  $13.50 \text{ mg mL}^{-1}$  odwirowałem. Następnie odwirowany mikrożel redispersowałem w 1 mL roztworu buforu fosforanowego ( $\text{pH} = 7.4$ ), w którym wcześniej rozpuściłem 0.25 mg doksorubicyny. Powyższą mieszaninę mikrożelu z lekiem przechowywałem w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 24 h w celu osiągnięcia równowagi absorpcyjnej leku w mikrożelu. Następnie mikrożel ze zmagazynowanym lekiem schłodziłem do temperatury  $25^\circ\text{C}$ . W celu usunięcia leku niezaadsorbowanego lub zaadsorbowanego na powierzchni mikrożelu, próbkę – mikrożel-lek odwirowałem (14000 rpm, 50 min,  $25^\circ\text{C}$ ) i redispersowałem w 1 mL czystego buforu fosforanowego. Czynność tę powtarzałem pięciokrotnie, za każdym razem zbierając supernatant, zawierający wolną, niezwiązaną z mikrożelem doksorubicynę. Procedurę umieszczenia leku w mikrożelu p(NIPA-BISS) przedstawiłem na rysunku 57. Odejmując masę leku obecnego w supernatancie od masy leku zmieszanego z mikrożelem, tj. 0.25 mg, obliczyłem masę leku związanego z mikrożelem. Stężenie doksorubicyny w supernatancie oznaczyłem spektrofotometrycznie, w przepływie za pomocą pompy perystaltycznej połączonej z badaną próbką i spektrofotometrem, mierząc absorbancję przy 480 nm (patrz rysunek 58). Względna ilość zmagazynowanego w mikrożelu leku – względem ilości czynnika sieciującego ( $\frac{n_{\text{DOX}}}{n_{\text{BISS}}} 100\%$ ) – wyniosła więcej niż 10%.

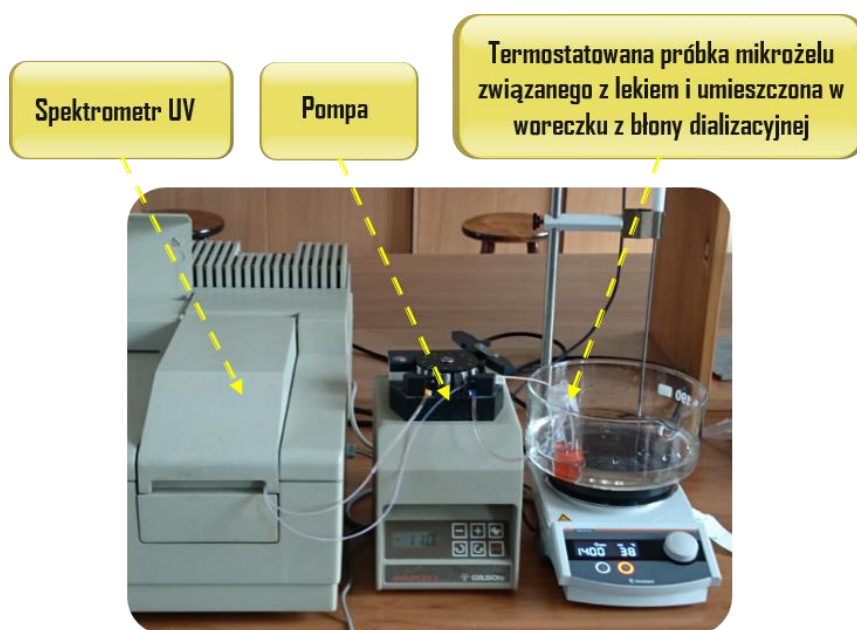


**Rysunek 57.** Zobrazowanie procedury umieszczenia leku przeciwnowotworowego – doksorubicyny w mikrożelu p(NIPA-BISS3%).



### 11.6.2. Badanie uwalniania doksorubicyny z mikrożelu na skutek jego degradacji

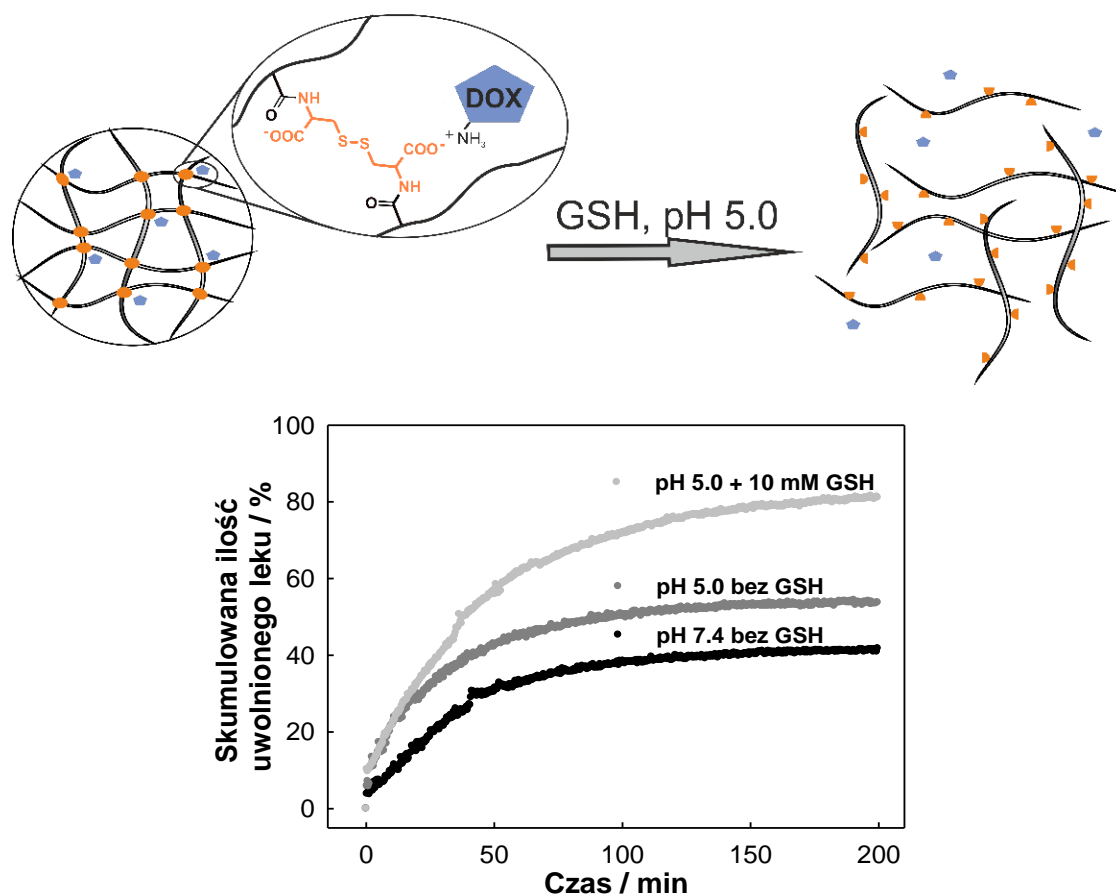
Oprócz bardziej redukujących warunków, panujących w komórkach nowotworowych niż w komórkach zdrowych, w nowotworach panuje także niskie pH (ok. 5.0), dlatego też dążeniem jest ograniczanie uwolnienia leku z mikrożelu do takich warunków, jakie panują w komórkach rakowych. Pomiary związane z uwalnianiem leku prowadziłem w warunkach typowych dla komórek zdrowych oraz w warunkach, jakie panują w komórkach nowotworowych. W tym celu porcję mikrożelu p(NIPA-BISS3%) + DOX umieściłem w 3 mL buforu fosforanowego (pH = 7.4) oraz buforu octanowego (pH = 5.0) i przenieśliem do woreczka z błony dializacyjnej (MWCO, 10 kDa). Woreczek – błonę umieściłem w 20 mL odpowiedniego buforu (pH = 7.4 oraz 5.0) z dodatkiem lub bez dodatku 10 mM GSH. Bufor łagodnie mieszałem w trakcie pomiaru (300 rpm). Temperaturę buforu utrzymałem na stałym poziomie (37°C), ponieważ jest to temperatura zbliżona do temperatury ludzkiego ciała. Końcowe stężenie mikrożeli wynosiło ok. 1 mg mL<sup>-1</sup>. Uwalnianie leku z mikrożelu p(NIPA-BIS3%) nastąpiło od razu po umieszczeniu woreczka z błony dializacyjnej w buforze. Zbadałem je mierząc absorbancję dializatu/buforu, w którym umieszczony był woreczek, a w nim doksorubicyna związana z mikrożelem. W systemie przepływowym bufor, w którym umieszczony był woreczek, zawierał uwolniony z woreczka lek i kierowany był do kuwety umieszczonej w spektrofotometrze UV-Vis (patrz rysunek 58).



**Rysunek 58.** Spektrometr UV połączony z pompą i badaną, termostatowaną próbką.

Stężenie uwolnionej doksorubicyny określiłem na podstawie zmierzonej absorbancji przy 480 nm.

Na rysunku 59 przedstawiłem wpływ pH oraz obecności czynnika redukującego (GSH) na profil uwalniania doksorubicyny z mikrożelu w temperaturze 37°C. W pH 7.4 skumulowana ilość uwolnionej doksorubicyny po dwóch godzinach wynosiła ok. 40%, natomiast w kwaśnych warunkach (pH = 5.0) ok. 50%. Największa ilość uwolnionego leku (ok. 80%) pojawiła się dla pH = 5.0 w obecności GSH (10 mM). Zatem zmiana warunków środowiska, jakie panują we krwi (pH – 7.4), na warunki typowe dla komórek nowotworowych (pH – 5.0 oraz  $C_{\text{GSH}} = 10 \text{ mM}$ ) powinna wywołać uwolnienie znacznie większej ilości doksorubicyny.



**Rysunek 59.** Profil uwalniania doksorubicyny z mikrożelu p(NIPA-BISS3%) w środowisku o różnym pH w obecności i nieobecności GSH.  $T = 37^\circ\text{C}$ .

## 11.7. Testy żywotności komórek *in vitro*

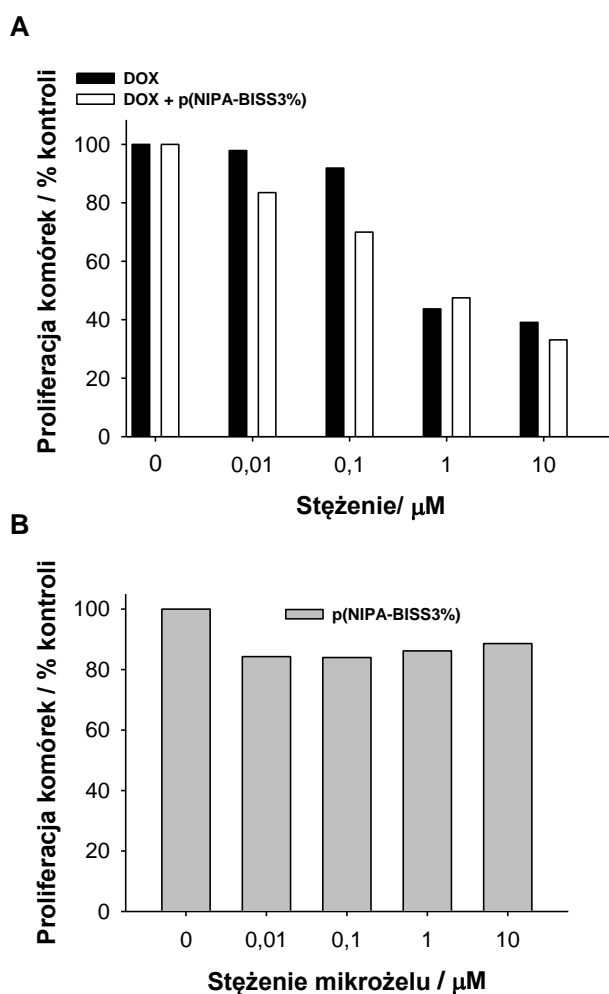
### 11.7.1. Hodowla komórkowa

Ostatnim etapem pracy były badania cytotoksyczności. Wykonała je dr hab. Ewa Augustyn z Zakładu Technologii Leków Politechniki Gdańskiej. Najpierw wyhodowano komórki, na których był testowany mikrożel. Cytotoksyczność mikrożeli p(NIPA-BISS3%), p(NIPA-BISS3%) + DOX oraz wolnej DOX zbadano wobec komórek HT29 ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego (raka okrężnicy). Komórki te są przedstawicielami guzów litych, bardzo często opornych na terapię przeciwnowotworową i dlatego zostały one wybrane do testów cytotoksyczności. Ponadto rak jelita grubego jest najczęściej występującym na świecie rodzajem raka. Linię komórkową HT29 otrzymano z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC) i testowano ją na mykoplazmie przy użyciu uniwersalnego zestawu ATCC-30-1012K do wykrywania mykoplazmy. Komórki były hodowane na podłożu McCoy'a 5A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), uzupełnionego 10% płodową surowicą cielęcą, inaktywowaną termicznie oraz antybiotykami (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycyny oraz 100 U  $\text{mL}^{-1}$  penicyliny) w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  i temperaturze 37°C. W takich warunkach czas podwojenia ich liczby wynosił 24 h. Wszystkie eksperymenty były przeprowadzone dla komórek rosnących w tempie wykładniczym.

### 11.7.2. Testy cytotoksyczności

Żywotność komórek mierzono za pomocą testu redukcji soli tetrazolowej (MTT – substratu rozpuszczalnego w wodzie, o zabarwieniu białym lub żółtym) do nierozpuszczalnego formazanu (o zabarwieniu ciemno-niebieskim). Ilość barwnego zredukowanego MTT była proporcjonalna do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji. Komórki wysiano na 24-studzienkowe płytki ( $2 \cdot 10^4$  komórek na studzienkę) i poddano, przez okres 72 h, działaniu mikrożeli p(NIPA-BISS3%), mikrożeli p(NIPA-BISS3%) + DOX oraz wolnej doksorubicyny w różnych stężeniach. Roztwory mikrożeli oraz leku przygotowano w sterylnej wodzie dejonizowanej. Następnie do każdej studzienki dodano 0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$  MTT i dalej inkubowano przez 3 h w temperaturze 37°C. Pożywkę usunięto, natomiast kryształki formazanu rozpuszczono w DMSO. Na koniec formazan oznaczono ilościowo przy 540 nm w czytniku

mikropłytek. Wpływ cytotoksyczności uwolnionego z mikrożeli leku lub niezwiązanego leku wyrażono za pomocą wartości parametru  $IC_{50}$  (stężenie leku wymagane do zahamowania wzrostu komórek o 50% w porównaniu z komórkami kontrolnymi, nienarażonymi na działanie leku). Test proliferacji MTT wykazał, że po 72 h ekspozycji komórek HT29 na działanie mikrożeli p(NIPA-BISS3%) + DOX oraz samej DOX, żywotność komórek uległa zmniejszeniu w sposób zależny od dawki wolnego lub związanego z mikrożelem leku (patrz rysunek 60A).



**Rysunek 60.** A – wpływ cytotoksyczności mikrożeli p(NIPA-BISS3%) + DOX oraz niezwiązanej z mikrożelem doksorubicyny na komórki HT29 ludzkiego nowotworu okrężnicy po 72 h oddziaływania, wyznaczonej za pomocą testu MTT. Hamowanie wzrostu komórek wyrażone jest jako procent wartości kontrolnej (komórki niepotraktowane). B – wpływ cytotoksyczności czystego mikrożelu p(NIPA-BISS3%) na komórki HT29 w identycznych warunkach eksperymentalnych.

Co ciekawe, mikrozele p(NIPA-BISS3%) + DOX wykazywały porównywalną cytotoksyczność do wolnej doksorubicyny ( $IC_{50} = 0.81$  oraz  $0.75 \mu M$ , odpowiednio dla

mikrożeli z lekiem oraz samego leku). Należy też dodać, że sam mikrożel p(NIPA-BISS3%) w szerokim zakresie stężeń, łącznie z dawką równą  $IC_{50}$  dla mikrożelu p(NIPA-BISS3%) + DOX, nie hamował proliferacji komórek HT29 (patrz rysunek 60B). Względne odchylenie standardowe pomiarów cytotoksyczności nie przekraczało 8%.

## 11.8. Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują, że za pomocą polimeryzacji emulsyjnej bez udziału surfaktanta udało mi się wprowadzić do mikrożeli czułych na temperaturę (na bazie pNIPA) diakrylową pochodną cystyny. Zsyntezowane mikrożele tworzyły cząstki o budowie sferycznej, o zadowalająco wąskim rozkładzie wielkości. Pochodna cystyny była czynnikiem sieciującym, nadającym mikrożelowi degradowalność (poprzez redukcję mostków –S–S–) oraz czułość na zmiany pH (spowodowaną obecnością grup karboksylowych). Największą wrażliwość na zmiany pH wykazywały mikrożele p(NIPA-BISS3%). Obecność grup karboksylowych w mikrożelach doprowadziła także do poprawy ich stabilności w roztworach o dużej mocy jonowej. Natomiast indukowana redukcją mostków –S–S– degradacja otrzymanych mikrożeli, za pomocą roztworu GSH lub DTT o stężeniu 0.01 M, prowadziła do zniszczenia sferycznych cząstek mikrożelu.

Wzrost zawartości diakrylowej pochodnej cystyny w mikrożelu prowadził do wzrostu zarówno temperatury objętościowego przejścia fazowego, jak i stabilności otrzymanych mikrożeli. Mikrożel z 3% zawartością pochodnej cystyny był wysoce stabilny w szerokim zakresie temperatury, pH i siły jonowej, włączając w to warunki fizjologiczne ( $pH = 7.4$ ,  $C_{NaCl} = 0.15$  M,  $T = 37^{\circ}C$ ), jednak nie degradował całkowicie w obecności czynników redukujących. Natomiast mikrożel z najmniejszą zawartością czynnika sieciującego, tj. 1%, degradował całkowicie, ale nie był stabilny w warunkach fizjologicznych.

Obecność grup karboksylowych w czynniku sieciującym pozwoliła również na zmagazynowanie doksorubicyny w mikrożelach (elektrostatyczne oddziaływanie grup aminowych leku ze zjonizowanymi grupami karboksylowymi mikrożelu), a następnie jej uwolnienie. Zaobserwowałem znaczny wzrost skumulowanego

uwalniania DOX z mikrożelu w warunkach podobnych do warunków panujących w komórkach nowotworowych (pH ~ 5.0 oraz  $C_{GSH} \sim 10$  mM). Testy cytotoksyczności dowiodły, że mikrożel p(NIPA-BISS3%) ze zmagazynowanym lekiem wykazywał cytotoksyczność wobec wybranych komórek HT29 podobną do leku w stanie wolnym niezwiązanym z mikrożelem, natomiast sam mikrożel, niezwiązany z lekiem, nie hamował proliferacji komórek. W związku z powyższym otrzymane mikrożele stały się interesujące jako nośniki leku, które mogą być wykorzystane w systemach dostarczania leków. Obecność grup karboksylowych stwarza dalszą możliwość chemicznej modyfikacji mikrożeli, poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy grupami aminowymi leku a grupami karboksylowymi mikrożelu, po ich wcześniejszej aktywacji za pomocą (na przykład) 1-etylo-3-(3-dimetylo-aminopropylo)karbodiimidu (EDC) i *N*-hydroksysukcynimidu (NHS).

## 12. Streszczenie pracy

Niniejszą rozprawę doktorską poświęciłem zagadnieniom związanym z syntezą oraz charakterystyką nowych środowiskowo-czułych mikrohydrożeli polimerowych, bazą do otrzymania których był poli(*N*-izopropylakryloamid) – p(NIPA). Waga mikrohydrożeli rośnie szybko ze względu na ich znacznie korzystniejsze cechy w porównaniu do hydrożeli o klasycznych rozmiarach. Badania były głównie ukierunkowane na zjawisko przejścia fazowego i związaną z tym zmianą objętości/rozmiarów mikrożeli polimerowych. Potencjalne zastosowania mikrohydrożeli były ważnym elementem badań. Stosując odpowiednie modyfikacje monomerów, otrzymałem mikrozele czułe na takie bodźce, jak: temperatura, pH, siła jonowa i obecność niektórych jonów. Niektóre mikrozele były elektroaktywne i przewodzące. Inne mogły degradować się pod wpływem odpowiedniego bodźca.

Praca tradycyjnie rozpoczyna się wstępem i częścią literaturową. W rozdziale pierwszym zawarłem krótkie wprowadzenie w podjętą tematykę badawczą oraz przedstawiłem główne cele, które były realizowane w trakcie przeprowadzonych prac badawczych.

W rozdziale drugim omówiłem problemy związane z polimerami czułymi na temperaturę. Przedstawiłem w nim podstawowe fakty dotyczące zjawiska przejścia fazowego termo-czułych nieusieciowanych polimerów. Na przykładzie polimeru pNIPA przedstawiłem, jaki wpływ na temperaturę przejścia fazowego polimeru mają czynniki zewnętrzne oraz opisałem termodynamikę przejścia fazowego. Rozdział drugi kończy półempiryczna teoria Floryego-Hugginsa, dotycząca zjawiska przejścia fazowego.

Podstawowe fakty, definicje oraz podział żeli polimerowych (usieciowanych polimerów), przedstawiłem w rozdziale trzecim. Rozdział ten omawia objętościowe przejście fazowe hydrożeli, opartych na pNIPA, ze stanu napęcniałego w skurczony. W rozdziale tym swoją uwagę skupiłem na termodynamice, mechanizmie i szybkości objętościowego przejścia fazowego hydrożeli pNIPA.

Rozdział czwarty jest najbardziej obszerny i dotyczy mikrohydrożeli. Przedstawiłem w nim definicję, klasyfikację, metody syntezy mikrożeli oraz metody ich charakteryzacji. Opisałem mikrozele czułe na różne bodźce środowiskowe oraz kompozyty mikrożeli z nanocząstkami metali oraz polimerami przewodzącymi, ze szczególnym uwzględnieniem polianiliny.

Część literaturową pracy kończy rozdział piąty, w którym przytoczyłem przykłady zastosowań i prób zastosowań mikrożeli w różnych dziedzinach życia, ze szczególnym uwzględnieniem mikrożeli w roli nośników leków. W rozdziale tym opisałem także sposoby magazynowania, a następnie uwalniania z mikrożeli leków.

Część eksperymentalna zawarta jest w rozdziałach od szóstego do jedenastego. Tę część rozpoczyna opis oraz szczegółowa charakterystyka odczynników, aparatury oraz metod pomiarowych, stosowanych w pracy badawczej (rozdziały 6 i 7). Kolejny rozdział dotyczy obiektów badań. Dużo miejsca poświęciłem w nim opisowi procedury syntezy, oczyszczania oraz przygotowania próbek mikrożeli, stanowiących obiekty badań.

Uzyskane wyniki eksperymentalne przedstawione są w rozdziałach od dziewiątego do jedenastego. Pierwsze opisyane eksperymenty (rozdział dziewiąty) dotyczą wprowadzenia aminokwasu – L-ornityny, zmodyfikowanego grupą akrylową podczas polimeryzacji mikrożelu p(NIPA-BIS). Pozwoliło to otrzymać nowy termo- i pH- czuły materiał – p(NIPA-BIS-AcOrn). W zależności od pH mogłem otrzymać różnie naładowane łańcuchy w mikrożelu, w tym łańcuchy z amfijonami. W rozdziale tym opisałem wyniki badań wpływu pH, temperatury oraz zawartości monomeru modyfikującego na stopień napężnienia mikrożeli p(NIPA-BIS-AcOrn) oraz zbadałem morfologie otrzymanych materiałów. Okazało się, że szczególnie interesujący – z punktu widzenia dalszych zastosowań – wydaje się być mikrożel, zawierający w sieci polimerowej 20% AcOrn. Wykazywał on duże zmiany stopnia spęcznienia przy zmianie pH w temperaturze zbliżonej do temperatury ludzkiego ciała. Zachowanie takie jest szczególnie pożądane dla materiałów, które mogą być potencjalnie stosowane w systemach dostarczających leki. Ponadto obecność wolnych grup  $\alpha$ -aminokwasowych, przyłączonych do sieci polimerowej, potencjalnie pozwala na dalszą modyfikację mikrożelu, np. białkami, poprzez utworzenie wiązania z grupą



$\alpha$ -aminokwasową. Obecność aktywnych grup  $\alpha$ -aminokwasowych, przyczepionych do sieci polimerowej, umożliwiła kompleksowanie niektórych kationów metali. Okazało się, że obecność jonów miedzi, które tworzą stabilne kompleksy z  $\alpha$ -aminokwasem, miała silny wpływ na stopień napężnienia mikrożeli. Obecność jonów miedzi(II) skutkowała zmniejszeniem rozmiarów mikrożeli, w każdych badanych przeze mnie warunkach. Zdolność mikrożeli do wiązania jonów metali ciężkich oraz ich czułość na zmiany pH i temperatury – czyni je interesującymi materiałami w procesach ekstrakcji. Dodatkowo wykazałem, że zastosowanie pochodnej ornityny wyeliminowało konieczność jednoczesnego wprowadzania dwóch monomerów, kwasowego i zasadowego, i tym samym doprowadziło do szybkiej, zaawansowanej modyfikacji pierwotnego mikrożelu.

Rozdział dziesiąty zawiera wyniki badań, poświęconych charakterystyce kompozytu mikrożelu p(NIPA-BIS) z polianiliną, otrzymanego dzięki wykorzystaniu – opracowanej w naszej Pracowni – tzw. polimeryzacji międzyfazowej, którą prowadziłem w temperaturze 5°C. Kombinacja/połączenie termo-czułego mikrożelu i polianiliny, doprowadziła do uzyskania materiału, który wykazywał właściwości charakterystyczne dla obu komponentów. Badania z użyciem mikroskopii elektronowej wykazały, że mikrokompozyt tworzył sferyczne cząstki, posiadające kałafiorowatą oraz chropowatą strukturę, o równomiernie rozłożonych w całej objętości mikrożeli nanowłóknach polianiliny. Mikrokompozyt wykazywał szybkie ( $< 0.7$  s) oraz odwracalne przejście fazowe, wywołane zmianą temperatury. PANI nie była związana chemicznie z siecią polimerową mikrożelu, lecz oddziaływała z nią fizycznie. Kurczenie się kompozytu pod wpływem wzrostu temperatury znacznie zwiększało sygnał woltamperometryczny, pochodzący od polianiliny, a jego przewodnictwo było o rząd wielkości większe niż przewodnictwo niezmodyfikowanego mikrożelu p(NIPA-BIS). W konsekwencji kompozyt p(NIPA-BIS)/PANI wykazywał wysokie przewodnictwo, a jego odpowiedź woltamperometryczna silnie zależała od stanu spęcznienia. Otrzymany mikrokompozyt może być interesującym materiałem do (na przykład) wytwarzania przełączalnych systemów elektrochemicznych oraz sensorów.

W rozdziale jedenastym zamieściłem rezultaty badań, dotyczących degradacji mikrożelu na bazie pNIPA usieciowanego za pomocą diakrylowej pochodnej cystyny.

Pochodna cystyny nadała mikrożelowi degradowalność (poprzez redukcję mostków –S–S–) oraz czułość na zmiany pH (obecność grup karboksylowych). W rozdziale tym opisałem wyniki badań wpływu pH, temperatury, siły jonowej oraz zawartości monomeru modyfikującego na stopień napężnienia mikrożeli p(NIPA-BISS). Zbadałem stabilność koloidalną mikrożeli w środowisku o różnej mocy jonowej (różnym stężeniu NaCl). Określiłem efektywność dwóch reduktorów mostków disiarczkowych: ditiotreitolu (DTT) oraz glutationu (GSH), w degradacji mikrożeli zawierających różną ilość czynnika sieciującego. Zbadałem morfologię otrzymanych mikrożeli – przed oraz po degradacji – oraz skuteczność uwalniania wcześniej umieszczonego w mikrożelu leku przeciwnowotworowego – doksorubicyny. Największą wrażliwość na zmiany pH wykazywały mikrożele zawierające 3% pochodnej cystyny. Obecność grup karboksylowych w mikrożelach doprowadziła także do poprawy ich stabilności w roztworach o dużej mocy jonowej. Natomiast redukcja mostków –S–S– za pomocą roztworu GSH lub DTT, o stężeniu 0.01 M, doprowadziła do zniszczenia sferycznych cząstek mikrożelu. Wzrost zawartości diakrylowej pochodnej cystyny w mikrożelu prowadził do wzrostu, zarówno temperatury objętościowego przejścia fazowego, jak i stabilności otrzymanych mikrożeli. Mikrożel z 3% zawartością pochodnej cystyny był wysoce stabilny w szerokim zakresie temperatury, pH i siły jonowej, włączając w to warunki fizjologiczne ( $\text{pH} = 7.4$ ,  $C_{\text{NaCl}} = 0.15 \text{ M}$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ ), jednak nie degradował się całkowicie w obecności czynników redukujących. Z kolei mikrożel z najmniejszą zawartością czynnika sieciującego, tj. 1%, degradował się całkowicie, ale nie był wystarczająco stabilny; agregował w warunkach fizjologicznych. W związku z powyższym, w celu zbadania mikrożeli pod kątem ich możliwego zastosowania jako nośników leku w warunkach fizjologicznych – wybrałem mikrożele zawierające 3% czynnika sieciującego. Obecność grup karboksylowych w czynniku sieciującym pozwoliła mi na efektywne zmagazynowanie doksorubicyny w mikrożelach. Zaobserwowałem znaczny wzrost uwalniania DOX z mikrożelu w warunkach podobnych do warunków panujących w komórkach nowotworowych ( $\text{pH} \sim 5.0$  oraz  $C_{\text{GSH}} \sim 10 \text{ mM}$ ); było to spowodowane degradacją żelu. Przeprowadzone testy cytotoksyczności w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej przez dr Ewę Augustin dowiodły, że mikrożel p(NIPA-BISS3%) ze zmagazynowanym lekiem wykazywał cytotoksyczność wobec wybranych komórek nowotworowych jelita grubego – HT29, podobną do leku w stanie wolnym, niezwiązanym z mikrożelem. Natomiast sam

mikrożel, niezwiązany z lekiem, nie hamował proliferacji komórek. Otrzymane mikrożele okazały się być interesujące jako potencjalne nośniki leku.

W rozdziale trzynastym przedstawiłem spis prac opublikowanych w trakcie pracy doktorskiej, a w rozdziale czternastym zawarłem bibliografię.



### 13. Streszczenie pracy w języku angielskim

The main aim of the study was to synthesize and characterize new environmentally sensitive polymeric microhydrogels based on poly(*N*-isopropylacrylamide) – p(NIPA). Microhydrogels exhibit more advantages in comparison with regularly sized macrohydrogels. The accent was given to volume phase transition phenomenon: shrinking and swelling of the polymeric microgels. Potential applications of microhydrogels have also been an important element of the research. By using suitable modifications of the monomers I have obtained microgels sensitive to: temperature, pH, ionic strength and presence of some ions. Some obtained microgels were electroactive and conductive. Other microgels could be degraded in response to a suitable stimulus.

The thesis traditionally begins with an introduction. The first chapter of the thesis presents the subject of the research and the main objectives that have been realized in the course of the PhD work. In the second chapter, the main issues connected with the polymers sensitive to temperature are covered. In that chapter I have presented the basic facts about the phase transition of the thermosensitive, uncross-linked polymers. pNIPA was selected as an object to describe the influence of external factors on phase transition temperature. I have also described the thermodynamics of the phase transition. Chapter no. two ends with description of the Flory-Huggins theory. In chapter three I have presented basic facts, definitions and classifications of polymeric gels (cross-linked polymers). In that chapter I have described the volume phase transition, i.e. transition from the swollen- to the shrunken state of the hydrogels, using an example of pNIPA. Thermodynamics, mechanism and kinetics of the volume phase transition of the pNIPA hydrogels were discussed. The most extensive chapter is chapter four. It is devoted to microhydrogels. In that chapter I have presented a definition, classification and synthesis methods of microgels. I have described microgels that are sensitive to different environmental stimuli and presented composites consisting of microgels, metal nanoparticles and conductive polymers. Particular emphasis was given to polyaniline. Chapter five finishes the literature part. In that chapter I have referred to known applications of microgels in various areas of life with particular emphasis on microgels as drug carriers. In that chapter I have also described the methods of loading the drug and then releasing it from microgels.

The experimental part consists of six chapters (sixth to eleventh). It begins with description and detailed characterization of the chemicals, apparatus and experimental methods used in the work (chapters 6 and 7). The next chapter addresses the studied objects. A significant space was devoted to the procedures of synthesis, purification, and preparation of microgel samples.

The first experimental results are reported in chapter nine. There the introduction of natural amino acid – L-ornithine (modified with acrylic group) into the polymeric net during polymerization of p(NIPA-BIS) is depicted. Such modification of the polymer net of the microgels led to formation of a new thermo- and pH- sensitive material – p(NIPA-BIS-AcOrn). By changing pH I could obtain differently charged polymeric chains in the microgels, including chains with amfiions. In that chapter I have described the data on the influence of pH, temperature and amount of modifying monomer on swelling behavior of p(NIPA-BIS-AcOrn) microgels. The morphology of the obtained materials has also been described. It turned out that the microgel containing 20% of AcOrn in the polymeric network was a very interesting material in terms of further applications. That microgel exhibited big changes in swelling ratio in response to pH changes at a temperature near the body temperature. The reported behavior is especially favorable for the materials that are planned to use in drug delivery systems. Moreover, the presence of the  $\alpha$ -amino acid groups attached to the polymeric network allows further modification of microgels, e.g. with peptides through bonding to the  $\alpha$ -amino acid group. The presence of active  $\alpha$ -amino acid groups attached to the polymeric network also allows the complexation of some metals cations. It turned out, that the presence of copper ions, which form stable complexes with the  $\alpha$ -amino acid, had strong influence on the swelling behavior of the microgels. The presence of copper(II) ions led to a decrease in size of the microgels under all studied by me conditions. The ability of the microgels to bind heavy metal ions and their sensitivity to temperature and pH make them an interesting material for extraction processes. I have also shown that by using the derivative of ornithine the need for simultaneous introduction of two monomers, acidic and basic (to get a wide pH response), was eliminated and thus it led to a rapid, advanced modification of the original microgel.

Chapter ten contains the results dedicated to characteristics of the composite of microgel p(NIPA-BIS) with polyaniline. This composite was obtained by using

interphase polymerization (conducted at 5°C) which was developed in our laboratory. A combination of a polymeric thermosensitive microhydrogel and a conducting polymer led to the formation of materials that exhibited the properties characteristic for both components. The investigations done with the use of electron microscopy indicated that the new microcomposite formed spherical particles that possessed a cauliflower-like and rough structure with the polyaniline nanofibers evenly distributed in the entire volume of the microgels. The microcomposite exhibited a reversible, rapid ( $< 0.7$  sec), temperature-dependent volume phase transition. The microcomposite swelling behavior proved that PANI was not chemically bonded with the microgel network and interacted only physically. The shrinking process of the composite, induced by appropriate temperature increase, considerably enhanced the voltammetric response of polyaniline. The measured conductivity of the p(NIPA-BIS)/PANI microcomposites was by one order of magnitude bigger than the values obtained for the unmodified p(NIPA-BIS) microgel. Consequently, the composite exhibited high conductivity and its voltammetric response strongly depended on the swelling state. The obtained microcomposites can be an interesting material for e.g. switchable electrochemical systems and sensors.

In chapter eleventh, I have presented the results of studies aimed at degradation of the microgel based on pNIPA crosslinked with diacryloyl derivative of cystine (BISS). The derivative of cystine made the microgels degradable due to possible reduction of  $-S-S-$  bridges. It made them also sensitive to pH due to the presence of carboxylic groups. In that chapter I have described the influence of temperature, pH, ionic strength and amount of modifying monomer on the swelling behavior of the p(NIPA-BISS) microgels. The colloidal stability of new microgels in the environment was investigated in function of ionic strength (different concentration of NaCl). I have determined the efficiency of two types of disulfide-bridge reducing agents: dithiothreitol (DTT) and glutathione (GSH) in the degradation process of the microgels containing different amounts of the crosslinking agent. I have described morphology of the obtained microgels before and after degradation and the efficiency of anticancer drug – doxorubicine in loading and consecutive controlled release into and from the microgels, respectively. The microgels containing 3% of derivative of cystine exhibited the highest sensitivity to pH. The presence of carboxylic groups in the microgels has improved their stability vs. ionic strength. The reduction of  $-S-S-$  bridges by GSH and DTT at a concentration of 0.01 M led to the destruction of spherical microgel particles.

An increase in the content of amino acid led to an increase in the volume phase transition temperature (VPTT) and an increase in the stability of the microgels. The microgels with 3% content of the amino acid were highly stable in wide ranges of temperature, pH and ionic strength, including the physiological conditions (pH = 7.4, IS = 0.15 M, 37°C); however, they were degraded incompletely in the presence of the reducing agents. In turn, the microgels with the lowest amount of crosslinking agent, i.e. 1%, were completely degraded; however, were not sufficiently stable. They aggregated under physiological conditions. Therefore, for the investigation of usefulness of the microgels as a drug carrier under physiological conditions I chose microgels containing 3% of the crosslinking agent. The presence of the carboxylic group in the cross-linker allowed me to efficiently load doxorubicin into the microgels. The efficient release of the drug took place after microgel degradation under conditions similar to those in the affected (by cancer) cells (pH ~ 5.0 and  $C_{\text{GSH}} \sim 10 \text{ mM}$ ). The cytotoxicity tests were carried out at the Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, University of Technology of Gdansk by dr Ewa Augustin. They proved that the DOX loaded p(NIPA-BISS3%) microgels were cytotoxic against selected human colon carcinoma HT29 cells similarly to DOX alone, while unloaded gel microparticles did not inhibit proliferation of the cells. These properties make the microgels cross-linked with the derivative of cystine interesting as useful carriers in directed drug delivery systems.

The thesis ends with a list of articles published during the PhD work and a list of references.



## 14. Spis publikacji powstałych w trakcie realizacji pracy doktorskiej

Przedstawione w części eksperymentalnej wyniki badań, prowadzonych w trakcie realizacji pracy doktorskiej, stanowiły podstawę następujących publikacji:

1. Maćkiewicz M., Kaniewska K., Romański J., Augustin E., Stojek Z., Karbarz M. „Stable and degradable microgels linked with cystine for storing and environmentally triggered release of drugs” *Journal of Materials Chemistry B* 3, 2015, 7262.
2. Maćkiewicz M., Romański J., Karbarz M. „New ampholytic microgels based on *N*-isopropylacrylamide and  $\alpha$ -amino acid: changes in swelling behavior as a function of temperature, pH and divalent cation concentration” *RSC Advances* 4, 2014, 48905.
3. Maćkiewicz M., Rapecki T., Stojek Z., Karbarz M. „Environmentally sensitive, quickly responding microgels with lattice channels filled with polyaniline” *Journal of Materials Chemistry B* 2, 2014, 1483.

Ponadto w trakcie studiów doktoranckich powstały publikacje, których materiał nie został wprowadzony do pracy doktorskiej:

4. Maćkiewicz M., Karbarz M., Romański J., Stojek Z. „Environmentally sensitive three-component hybrid microgel” *RSC Advances* 6, 2016, 83493.
5. Nowicka A.M., Krasnodębska-Ostręga B., Wrzosek B., Jastrzębska M., Sadowska M., Maćkiewicz M., Stojek Z. „Detection of oxidative damage of synthetic oligonucleotides caused by thallium(III) complexes” *Electroanalysis* 26, 2014, 340.
6. Nowicka A.M., Maćkiewicz M., Matysiak E., Krasnodębska-Ostręga B., Stojek Z. „Voltammetric and electrochemical gravimetric selective detection of interactions between Tl(I) and guanine and the influence on activity of DNA drug-intercalators” *Talanta* 106, 2013, 85.



## 15. Bibliografia

1. Braun D., Cherdon H., Rehahn M., Ritter H., Voit B., *Polymer Synthesis: Theory and Practice. Fundamentals, Methods, Experiments*, Springer, Berlin, 2005.
2. Gil E.S., Hudson S.M., *Progress in Polymer Science* 29, 2004, 1173.
3. Rzaev Z.M.O., Dincer S., Piskin E., *Progress in Polymer Science* 32, 2007, 534.
4. Alarcon C.D.H., Pennadam S., Alexander C., *Chemical Society Reviews* 34, 2005, 276.
5. Schmaljohann D., *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 2006, 1655.
6. Inomata H., Goto S., Saito S., *Macromolecules* 23, 1990, 4887.
7. Shibayama M., Tanaka T., *Advances in Polymer Science* 109, 1993, 1.
8. Taylor L.D., Cerankowski L.D., *Journal of Polymer Science, Polymer Chemistry Edition* 13, 1975, 2551.
9. Billmeyer W.F., *Textbook of Polymer Science*, John Wiley & Sons, New York, 1970.
10. Costa R.O.R., Freitas R.F.S., *Polymer* 43, 2002, 5879.
11. Tian H.Y., Yan J.J., Wang D., You C.G.Z., Chen X.S., *Macromolecular Rapid Communications* 32, 2011, 660.
12. Durand A., Hourdet D., *Polymer* 41, 2000, 545.
13. Boutris C., Chatzi E.G., Kiparissides C., *Polymer* 38, 1997, 2567.
14. Schild H.G., *Progress in Polymer Science* 17, 1992, 163.
15. Schild H.G., Tirrell D.A., *Polymer Preprints (ACS)* 30, 1989, 350.
16. Lin S.Y., Chen K.S., Liang R.C., *Polymer* 40, 1999, 2619.
17. Saunders B.R., Vincent B., *Advances in Colloid and Interface Science* 80, 1999, 1.
18. Pei Y., Chen J., Yang L.M., Shi L.L., Tao Q., Hui B.J., Li R., *Journal of Biomaterials Science – Polymer Edition* 15, 2004, 585.
19. Schild H.G., Tirrell D.A., *Journal of Physical Chemistry* 94, 1990, 4352.
20. Kubota K., Fujishige S., Ando I., *Polymer Journal* 22, 1990, 15.
21. Furyk S., Zhang Y. J., Ortiz-Acosta D., Cremer P.S., Bergbreiter D.E., *Journal of Polymer Science Part A – Polymer Chemistry* 44, 2006, 1492.
22. Von Hippel P.H., Wong K., *Science* 145, 1964, 577.
23. Ataman M., Boucher E., *Journal of Polymer Science Physics* 20, 1982, 1585.
24. Florin E., Kjellander R., Eriksson C., *Journal of Chemical Society of Faraday Trans* 80, 1984, 2889.
25. Tanford, C., *The Hydrophobic Effect*, Wiley, New York, 1980.
26. Eeckman F., Moes A.J., Amighi K., *International Journal of Pharmaceutics* 241, 2002, 113.
27. Eeckman F., Amighi K., Moes A.J., *International Journal of Pharmaceutics* 222, 2001, 259.
28. Suwa K., Yamamoto K., Akashi M., Takano K., Tanaka N., Kunugi S., *Colloid and Polymer Science* 276, 1998, 529.
29. Baltes T., Garret-Flaudy F., Freitag R., *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 37, 1999, 2977.

- 
- 30 Zhang Y.J., Furyk S., Bergbreiter D.E., Cremer P.S., *Journal of the American Chemical Society* 127, 2005, 14505.
31. Inomata H., Saito S., *Fluid Phase Equilibria* 82, 1993, 291.
32. Mukae, K., Sakurai M., Sawamura S., Makino K., Kim S.W., Ueda I., Shirahama K., *Journal of Chemical Physics* 97, 1993, 737.
33. Hirotsu S., Okajima T., Yamamoto T., *Macromolecules* 28, 1995, 775.
34. Winnik F.M., Ottaviani M.F., Bossmann S.H., Garcia-Garibay M., Turro N.J., *Macromolecules* 25, 1992, 6007.
35. Wolf B.A., Willms M.M., *Macromolecular Chemistry* 179, 1978, 2265.
36. Fujishige S., *Polymer Journal* 19, 1987, 297.
37. Esteve A., Bail A., Landa G., Dkhissi A., Brut M., Rouhani M.D., Sudor J., Gue A.M., *Chemical Physics* 340, 2007, 12.
38. Smith G.D., Bedrov D., *Journal of Physical Chemistry B* 107, 2003, 3095.
39. Ahmed Z., Gooding E.A., Pimenov K.V., Wang L.L., Asher S.A., *Journal of Physical Chemistry B* 113, 2009, 4248.
40. Luna Barcenas G., Gromov D.G., Meredith J.C., Sanchez I.C., dePablo J.J., Johnston K.P., *Chemical Physics Letters* 278, 1997, 302.
41. Heskins M., Guillet J. E., *Journal of Macromolecular Science. Part A, Pure & Applied Chemistry* 2, 1968, 1441.
42. Lele A.K., Hirve M.M., Badiger M.V., Mashelkar R.A., *Macromolecules* 30, 1997, 157.
43. Inomata H., Nagahama K., Saito S., *Macromolecules* 27, 1994, 6459.
44. Tanaka T., *Polymer* 20, 1979, 1404.
45. Flory P.J., *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, 1953
46. Łukaszek M., Karbarz M., Stojek Z., *Zeszyty Naukowe SGSP* 38, 2009, 81.
47. Glados S., Maciejewski M., *Wiadomości Chemiczne* 52, 1998, 101.
48. Prestwich D.G., Marecak M.D., Marecak F.J., Vercruysse P.K., Ziebell R.M., *Journal of Controlled release* 53, 1998, 93.
49. Rosiak J.M., Janik I., Kadłubowski S., Kozicki M., Kujawa P., Stasica P., *Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Application in Radiation Synthesis and Modification of Polymers for Biomedical Applications*, IAEA, Vienna, 2002.
50. Swarbcick J., Boylan J.C., *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York, 2000.
51. Hoffman A.S., *Advanced Drug Delivery Reviews* 43, 2002, 3.
52. Amin S., Rajabnezhad S., Kohli K., *Scientific Research and Essay* 3, 2009, 1175.
53. Slaughter B.V., Khurshid S.S., Fisher O.Z., Khademhosseini A., Peppas N., *Advanced Materials* 21, 2009, 3307.
54. Lee S.B., Ha D.I., Cho S.K., Lee Y.M., Kim S.J., *Journal of Applied Polymer Science* 92, 2004, 2612.
55. Xu J.B., Bartley J.P., Johnson R.A., *Journal of Applied Polymer Science* 90, 2003, 747.
56. Snellings G., Schacht E., Mondelaers W., Schacht E., *Polymer International* 52, 2003, 1653.

- 
57. Allcock H.R., *Water-Soluble Polyphosphazenes and Their Hydrogels*, Polymeric Materials Science and Engineering, Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials Science and Engineering, 1993.
58. Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 2000, 27.
59. Molina M.J., Gomez-Anton M.R., Pierola I.F., *Journal of Physical Chemistry B* 111, 2007, 12066.
60. You J.O. Auguste D.R., *Langmuir* 26, 2010, 4607.
61. Lau A.C.W., Wu Ch., *Macromolecules* 32, 1999, 581.
62. Gan L.H., Gan Y.Y., Deen G.R., *Macromolecules* 33, 2000, 7893.
63. Kawasaki H., Sasaki S., Maeda H., *The Journal of Physical Chemistry B* 101, 1997, 5089.
64. Lowe J.S., Chowdhry B.Z., Parsonage J.R., Snowden M.J., *Polymer* 39, 1998, 1207.
65. Kawaguchi H., Hoshino F., Ohtsuka Y. *Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* 7, 1986, 109.
- 66 Hazot P., Delair T., Pichot Ch., Chapel J.P., Elaissari A., *Compters Rendus Chimie* 6, 2003, 1417.
67. Duracher, D., Elaissari A., Pichot C., *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 37, 1999, 1823.
68. Putiłowia I., *Ćwiczenia laboratoryjne z chemii koloidów*, PWN, Warszawa, 1955.
69. Dusek K., Patterson D., *Journal of Polymer Science, Part A-2* 6, 1968, 1209.
70. Ptitsen O.B., Eizner Yu.E., *Biofizika* 10, 1965, 3.
71. Lifshitz I.M., Grosberg A.Y., Khokhlov A.R., *Reviews of Modern Physics* 50, 1978, 683.
72. Otake K., Inomata H., Konno M., Saito S., *Journal of Chemical Physics* 91, 1989, 1345.
73. Zuo Y., Jiao Z., Ma L., Song P., Wang R., Xiong Y., *Polymer* 98, 2016, 287.
74. Katayama S., Ohata A., *Macromolecules* 18, 1985, 2781.
75. Okano T., Bae Y.H., Jacobs H., Kim S.W., *Journal of Controlled release* 11, 1990, 255.
76. Nakanishi K., Ikari K., Okazaki S., Touhara H., *Journal of Chemical Physics* 80, 1984, 1656.
77. Bae Y.H., Okano T., Kim S.W., *Pharmaceutical Research* 8, 1991, 624.
78. Bae Y.H., Okano T., Kim S.W., *Pharmaceutical Research* 8, 1991, 531.
79. Yoshida R., Sakai K., Okano T., Sakurai Y., *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 3, 1992, 243.
80. Kwang S.O., Jeong S.O., Hyun S.Ch., Young Ch.B., *Macromolecules* 31, 1998, 7328.
81. Varga I., Gilnyi T., Meszaros R., Filipcsei G., Zrinyi M., *The Journal of Physical Chemistry B* 105, 2001, 9071.
82. Sierra-Martin B., Choi Y., Romero-Cano M.S., Cosgrove T., Vincent B., Fernandez-Barbero A., *Macromolecules* 38, 2005, 10782.
83. Flory P.J., Rehner J., *Journal of Chemical Physics* 11, 1943, 521.
84. Yoshida R., Kaneko Y., Sakai K., Okano T., Sakurai Y., Bae Y.H., Kim S.W., *Journal of Controlled release* 32, 1994, 97.
85. Yoshida R., Sakai K., Okano T., Sakurai Y., Bae Y.H., Kim S.W., *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 3, 1991, 155.

- 
86. Tanaka T., Sato E., Hirokawa Y., Hirotsu S., Peetermans J., *Physical Review Letters* 55, 1985, 2455.
87. Wang C., Li Y., Hu Z., *Macromolecules* 30, 1997, 4727.
88. Li Y., Tanaka T., *Journal of Chemical Physics* 92, 1990, 1365.
89. Tanaka T., *Physica* 140A, 1986, 261.
90. Tanaka T., Fillmore D.J., *The Journal of Chemical Physics* 70, 1979, 1214.
91. Wang J., Gan D., Lyon L.A., El-Sayed M.A., *Journal of the American Chemical Society* 123, 2001, 11284.
92. Yoshida R., Uchida K., Kaneko Y., Sakai K., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T., *Nature* 374, 1995, 240.
93. Hirose H., Shibayama M., *Macromolecules* 31, 1998, 5336.
94. Whitesides G.M., *Small* 1, 2005, 172.
95. Murray M.J., Snowden M.J., *Advances in Colloid and Interface Science* 54, 1995, 73.
96. Andrew M.S., Backhouse A.J., *US Patent* 242, 1980, 384.
97. Kawaguchi H., Fujimoto K. Mizuhara Y., *Colloid and Polymer Science* 270, 1992, 53.
98. Snowden M.J., Thomas P., Vincent B., *Analyst* 118, 1993, 1367.
99. Sawai T., Yamazaki S., Kariyama Y. Aizawa M., *Macromolecules* 24, 1991, 2117.
100. Burmistrova A., Klitzing R., *Journal of Materials Chemistry* 20, 2010, 3502.
101. Maćkiewicz M., Kaniewska K., Romański J., Augustin E., Stojek Z., Karbarz M., *Journal of Materials Chemistry B* 3, 2015, 7262.
102. Maćkiewicz M., Rapecki T., Stojek Z., Karbarz M., *Journal of Materials Chemistry B* 2, 2014, 1483.
103. Hirose Y., Amiya T., Hirokawa Y., Tanaka T., *Macromolecules* 20, 1987, 1342.
104. Maćkiewicz M., Romański J., Karbarz M., *RSC Advances* 4, 2014, 48905.
105. Pan Y.J., Chen Y.Y., Wang D.R., Wei Ch., Guo J., Lu D.R., Chu Ch.Ch., Wang Ch.Ch., *Biomaterials* 33, 2012, 6570.
106. Zhang X., Lu S., Gao C., Chen C., Zhang X., Liu M., *Nanoscale* 5, 2013, 6498.
107. Gaulding J.C., Smith M.H., Hyatt J.S., Fernandez-Nieves A., Lyon L.A., *Macromolecules* 45, 2012, 39.
108. Tanaka H., Nishio I., Sun S., Ueno-Nishio S., *Science* 218, 1982, 467.
109. Lyon L.A., Meng Z., Singh N., Sorrell C.D., Ashlee S.J., *Chemical Society Reviews* 38, 2009, 865.
110. Morimoto N., Endo T., Ohtomi M., Iwasaki Y., Akiyoshi K., *Macromolecular Bioscience* 5, 2005, 710.
111. Nishikawa T., Akiyoshi K., Sunamoto J., *Journal of the American Chemical Society* 118, 1996, 6110.
112. de Carvalho W., Djabourov M., *Rheologica Acta* 36, 1997, 591.
113. Omari A., Chauveteau G. Tabary R., *Colloids and Surfaces A – Physicochemical and Engineering Aspects* 225, 2003, 37.
114. Zhang H., Tumarkin E., Peerani R., Nie Z., Sullan R.M.A., Walker G.C., Kumacheva E., *Journal of the American Chemical Society* 128, 2006, 12205.
115. Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M.M., Axelos M.A.V., *Polymer Gels and Networks* 6, 1998, 393.

- 
116. Zhang H., Mardiyani S., Chan W.C.W., Kumacheva E., *Biomacromolecules* 2006, 7, 1568.
117. Kuo S.M., Niu G.C.C., Chang S.J., Kuo C.H., Bair M.S., *Journal of Applied Polymer Science* 94, 2004, 2150.
118. Bulone D., Biagio P.L.S., *Biophysical Journal* 57, 1990, A256.
119. Ortiz J., Aguilera J.M., *Food Science and Technology International* 10, 2004, 223.
120. Eichenbaum G.M., Kiser P.F., Dobrynin A.V., Simon S.A. Needham D., *Macromolecules* 32, 1999, 4867.
121. Kratz K., Hellweg T., Eimer W., *Polymer* 42, 2001, 6631.
122. Larsson A., Kuckling D., Schoenhoff M., *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 190, 2001, 185.
123. Kratz K., Lapp A., Eimer W., Hellweg T., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 197, 2002, 55.
124. Burmistrova A., Richter M., Uzum C., Klitzing R., *Colloid and Polymer Science* 289, 2011, 613
125. Pelton R.H., Pelton H.M., Morphesis A., Rowell R.L., *Langmuir* 5, 1989, 816.
126. Dorski C.M., Doyle F.J., Peppas N.A., *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 211, 1996, 417.
127. Peppas N.A., Huang Y., Torres-Lugo M., Ward J.H., Zhang J., *Annual Review of Biomedical Engineering* 2, 2000, 9.
128. Hatto N., Cosgrove T., Snowden M.J., *Polymer* 41, 2000, 7133.
129. Xiao X.C., Chu L.Y., Chen W.M., Wang S., Li Y., *Huagong Xuebao/Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* 55, 2004, 321.
130. Xiao X.C., Chu L.Y., Chen W.M., Wang S., Xie R., Xiao X.C., *Langmuir* 20, 2004, 5247.
131. Little K., Parkhouse J., *Lancet* II 2, 1962, 857.
132. Chen Y., Sajjadi S., *Journal of Applied Polymer Science* 131, 2014, 40781.
133. Gotoh T., Nakatani Y., Sakohara S., *Journal of Applied Polymer Science* 69, 1998, 895.
134. Frank M., Burkhard W., *Makromolecular Chemistry Rapid Communication* 12, 1991, 645.
135. Terashima T., Kojima H., Sawamoto M., *Chemistry Letters* 43, 2014, 1690.
136. Zuo Y., Guo N., Jiao Z., Song P., Liu X., Wang R., Xiong Y., *Journal of Polymer Science, part A: Polymer Chemistry* 2016, 54, 169.
137. Neyret S., Vincent B., *Polymer* 38, 1997, 6129.
138. Gan, D., Lyon L.A., *Journal of the American Chemical Society* 123, 2001, 8203.
139. Gan D., Lyon L.A., *Macromolecules* 35, 2002, 9634.
140. Nayak S., Lyon L.A., *Chemistry of Materials* 16, 2004, 2623.
141. Serpe M.J., Jones C.D., Lyon L.A., *Langmuir* 19, 2003, 8759.
142. Gilbert R.G., *Emulsion Polymerization: a mechanistic approach*, Academic Press, London, 1995
143. D'Emanuele A., Dinarvand R., *International Journal of Pharmaceutics* 118, 1995, 237.
144. Chai Z., Zheng X., Sun X., *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* 41, 2003, 159.
145. Snowden M.J., *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* 24, 1992, 803.
146. Ole Kiminta D.M., Luckham P.F., Lenon S., *Polymer* 36, 1995, 4827.

- 
147. Weissman J.M., Sunkara H.B., Tse A.S., Asher S.A., *Science* 274, 1996, 950.
148. Wu C., Zhou S., *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* 34, 1996, 1597.
149. Shiroya T., Tamura N., Yasui M., Fujimoto K., Kawaguchi H., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 4, 1995, 267.
150. Huang G., Gao J., Hu Z., John J.V.S., Ponder B.C., Moro D., *Journal of Controlled release* 94, 2004, 303.
151. Saunders B.R., *Langmuir* 20, 2004, 3925.
152. Liu T., Chen J., Sugihara S., Maeda Y., *Colloid Polym Sci* 290, 2012, 763.
153. Lopez V.C., Raghavan S.L., Snowden M.J., *Reactive and Functional Polymers* 58, 2004, 175.
154. Winnik F.M., *Macromolecules* 23, 1990, 233.
155. Winnik F.M., Ringsdorf H., Venzmer J., *Langmuir* 7, 1991, 905.
156. Ramil R.A., Laftah W.A., Hashim S., *RSC Advances* 3, 2013, 15543.
157. Liu H.Y., Zhu X.X., *Polymer* 40, 1999, 6985.
158. Ngoc N.L., Takaomi K., *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 2011, 1185.
159. Ohta H., Ando I., Fujishige S., Kubota K., *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* 29, 1991, 963.
160. Tokuhito T., Amiya T., Mamada A., Tanaka T., *Macromolecules* 24, 1991, 2936.
161. Kunz D., Burchard W., *Colloid and Polymer Science* 264, 1986, 498.
162. Nieuwenhuis E.A., Pathmamanoharan C., Vrij A., *Journal of Colloid and Interface Science* 1, 1981, 196.
163. Stacey K.A., Weatherhead R.H., Williams A., *Macromolecular Chemistry* 181, 1980, 2517.
164. Seelenmeyer S., Deike I., Rosenfeldt S., Norhausen Ch., Dingenouts N., Ballauff M., Narayanan T., Lindner P., *Journal of Chemical Physics* 114, 2001, 10471.
165. Chu B., *Laser light scattering: basic principles and practice*, Academic Press, Boston, 1991.
166. Pecora R., *Dynamic Light Scattering*, Plenum Press, New York, 1985.
167. Cao A., *Analytical Letters* 36, 2016, 3185.
168. Wu C., Zhou S., *Macromolecules* 30, 1997, 574.
169. Chee C.K., Rimmer S., Shaw D.A., Soutar I., Swanson L., *Macromolecules* 34, 2001, 7544.
170. Inomata H., Goto S., Otake K., Saito S., *Langmuir* 8, 1992, 687.
171. Panayiotou M., Garret-Flaudy F., Freitag R., *Polymer* 45, 2004, 3055.
172. Garret-Flaudy F., Freitag R., *Langmuir* 17, 2001, 4711.
173. Kim K.S., Kim M.H., Cho S.H., *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 11, 2005, 736.
174. Kim K.S., Vincent B., *Polymer Journal* 37, 2005, 565.
175. Loxley A., Vincent B., *Colloid and Polymer Science* 275, 1997, 1108.
176. Isik B., *Advances in Polymer Technology* 22, 2003, 246.
177. Nayak S., Lyon L.A., *Polymer Preprints* 44, 2003, 679.
178. Snowden M.J., Chowdhry B.Z., Vincent B., Morris G.E., *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions* 92, 1996, 5013.



- 
179. Kratz K., Hellweg T., Eimer W., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 170, 2000, 137.
180. Karg M., Pastoriza-Santos I., Rodriguez-Gonzalez B., Klitzing R., Wellert S., Hellweg T., *Langmuir* 24, 2008, 6300.
181. Crowther H.M., Vincent B., *Colloid and Polymer Science* 276, 1998, 46.
182. Winnik F.M., Ringsdorf H., Venzmer J., *Macromolecules* 23, 1990, 2415.
183. Wang N., Ru G., Wang L., Feng J., *Langmuir* 25, 2009, 5898.
184. Zhang G., Wu Ch., *Journal of the American Chemical Society* 123, 2001, 1376.
185. Asano M., Winnik F.M., Yamashita T., Horie K., *Macromolecules* 28, 1995, 5861.
186. McPhee W., Tam K.C., Pelton R., *Journal of Colloid and Interface Science* 156, 1993, 24.
187. Frank H.S., Wen W.Y., *Discussion of the Faraday Society* 23, 1957, 133.
188. Jones G., Dole M., *Journal of American Chemical Society* 51, 1929, 2950.
189. Jenkins H.D., Marcus Y., *Chemical Reviews* 95, 1995, 2695.
190. Samoilov O.Y., *Water and aqueous solutions*, Wiley Interscience, New York, 1972.
191. Fuoss R.M., *Journal of Polymer Science* 3, 1948, 603.
192. Routh A.F., Vincent B., *Langmuir* 18, 2002, 5366.
193. Daly E., Saunders B.R., *Langmuir* 16, 2000, 5546.
194. Park T.G., Hoffman A.S., *Macromolecules* 26, 1993, 5045.
195. Kim J.H., Lee T.R., *Langmuir* 23, 2007, 6504.
196. Zhai D., Liu, B., Shi Y., Pan L., Wang Y., Li W., Zhang R., Yu G., *ACS Nano* 7, 2013, 3540.
197. Zhang L., Shi G., *Journal of Physical Chemistry C* 115, 2011, 17206.
198. Ma J., Choudhury N.A., Sahai Y., Buchheit R.G.J., *Power Sources* 196, 2011, 8257.
199. Ahadian S., Ramon-Azcon J., Estili M., Liang X., Ostrovidov S., Shiku H., Ramalingam M., Nakajima K., Sakka Y., Bae H., Matsue T., Khademhosseini A., *Scientific Reports – Nature* 4, 2014, 4271.
200. Karbarz M., Gniadek M., Donten M., Stojek Z., *Electrochemistry Communications* 13, 2011, 714.
201. Rivero R.E., Molina M.A., Rivarola C.R., Barbero C.A., *Sensors and Actuators B: Chemical* 190, 2014, 270.
202. Shi Y., Ma Ch., Peng L., Yu G., *Advanced Functional Materials* 25, 2015, 1219.
203. Lin J., Tang Q., Hu D., Sun X., Li Q., Wu J., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering* 346, 2009, 177.
204. Lin C.L., Chiu W.Y., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 44, 2006, 1648.
205. Pich A., Lu Y., Boyko V., Friedrich Arndt K., Adler H.J.P., *Polymer* 44, 2003, 7651.
206. Lopez-Cabarcos E., Mecerreyes D., Sierra-Martin B., Romero-Cano M.S., Strunz P., Fernandez-Barbero A., *Physical Chemistry Chemical Physics* 6, 2004, 1396.
207. Zhang J. G., Xu S. Q., Kumacheva E., *Journal of the American Chemical Society* 126, 2004, 7908.
208. Xu S.Q., Zhang J.G., Paquet C., Lin Y.K., Kumacheva E., *Advanced Functional Materials* 13, 2003, 468.
209. Kim J., Serpe M.J., Lyon L.A., *Angewandte Chemie International Edition* 44, 2005, 1333.

- 
210. Ciric-Marjanovic G., *Synthetic Metals* 177, 2013, 1.
211. Deshpande P.P., Jadhav N.G., Gelling V.J., Sazou D., *Journal of Coatings Technology and Research* 11, 2014, 473.
212. Jia W., Su L., Lei Y., *Biosensors and Bioelectronics* 30, 2011, 158.
213. Yeh J.M., Liou S.J., Lai C.Y., Wu P.C., *Chemistry of Materials* 13, 2001, 1131.
214. Stejskal J., Sapurina I., Trchova M., *Progress in Polymer Science* 35, 2010, 1420.
215. Zhang Z., Deng J., Yu L., Wan, M., *Synthetic Metals* 158, 2008, 712.
216. Gospodinova N., Terlemezyan L., *Progress in Polymer Science* 23, 1998, 1443.
217. Fillaux F., Leygue N., Baddour-Hadjean R., Parker S., Colomban P., Gruger A., Régis A., Yu L.T., *Chemical Physics* 216, 1997, 281.
218. Fillaux F., *Solid State Ionics* 125, 1999, 69.
219. Fillaux F., Parker S.F., Yu L.T., *Solid State Ionics* 145, 2001, 451.
220. Hazot P., Chapel J.P., Pichot C., Elaissari A., Delair T., *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 40, 2002, 1808.
221. Goodwin J.W., Ottewill R.H., Pelton R., Vianello G., Yates D.E., *The British Polymer Journal* 10, 1978, 173.
222. Paine A.J., *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 28, 1990, 2485.
223. Aihara, T., Nakayama Y., *Progress in Organic Coatings* 14, 1986, 103.
224. Stankiewicz A., Jagoda Z., Zielinska K., Szczygiał I., *Materials and Corrosion* 66, 2015, 12
225. Joanna T.B., Vine G.J., Snowden M.J., *Colloid and Polymer Science* 289, 2011, 625.
226. Lu Y., Mei Y., Drechsler M., Ballauff M., *Angewandte Chemie – International Edition* 45, 2006, 813.
227. Ulanski P., Pawlowska W., Kadlubowski S., Henke A., Gottlieb R., Arndt K.F., Bromberg L., Hatton T.A., Rosiak J.M., *Polymers for Advanced Technologies* 17, 2006, 804.
228. Suzuki D., Kawaguchi H., *Langmuir* 21, 2005, 8175.
229. Zhang J.G., Xu S.Q., Kumacheva E., *Advanced Materials* 17, 2005, 2336.
230. Fujimoto K., Mizuhara Y., Tamura N., Kawaguchi H., *Journal of Intelligent Material Systems and Structures* 4, 1993, 184.
231. Achiha K., Ojima R., Kasuya Y., Fujimoto K., *Polymers for Advanced Technologies* 6, 1995, 534.
232. Seitz U., Pauly H.E., *Angewandte Macromolekulare Chemie* 76, 1979, 319.
233. Yasui M., Shiroya T., Fujimoto K., Kawaguchi H., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 8, 1997, 311.
234. Sasa N., Yamaoka T., *Advanced Materials* 6, 1994, 417.
235. Li P., Sen Gupta A.K., *Reactive & Functional Polymers* 44, 2000, 273.
236. Bromberg L., Temchenko M., Hatton T.A., *Langmuir* 19, 2003, 8675.
237. Nilsson P., Hansson P., *Journal of Physical Chemistry B* 109, 2005, 23843.
238. Al-Hashmi A.A., Al-Maamari R., Al-Shabibi I., Ahmed M., Al-Sharji H., Zaitoun A., *Journal of Applied Polymer Science* 131, 2014, 40921
239. Hoare T., Pelton R., *Macromolecules* 40, 2007, 670.

- 
240. Retama J.R., Lopez-Ruiz B., Lopez-Cabarcos E., *Biomaterials* 24, 2003, 2965.
241. Qu J.B., Chu L.Y., Yang M., Xie R., Hu L., Chen W.M., *Advanced Functional Materials* 16, 2006, 1865.
242. Lapeyre V., Gosse I., Chevreux S., Ravaine V., *Biomacromolecules* 7, 2006, 3356.
243. Lyon L.A., Debord J.D., Debord S.B., Jones C.D., McGrath J.G., Serpe M.J., *Journal of Physical Chemistry B* 108, 2004, 19099.
244. Xu S.Q., Zhang J.G., Kumacheva E., *Composite Interfaces* 10, 2003, 405.
245. Kato T., Fujimoto K., Kawaguchi H., *Polymers Gels and Networks* 2, 1994, 307.
246. Gu J.X., Xia F., Wu Y., Qu X.Z., Yang Z.Z., Jiang L., *Journal of Controlled Release* 117, 2007, 396.
247. Tan J.P.K., Tam K.C., *Journal of Controlled Release* 118, 2007, 87.
248. Lopez V.C., Hadgraft J., Snowden M.J., *International Journal of Pharmaceutics* 292, 2005, 137.
249. Ratner B.D., *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, 2nd ed., Elsevier Academic Press: Amsterdam Boston, p xii, 851, 2004.
250. Kopecek J., *Biomaterials* 28, 2007, 5185.
251. Drury J.L., Mooney D.J., *Biomaterials* 24, 2003, 4337.
252. Langer R., Peppas N.A., *AIChE Journal* 49, 2003, 2990.
253. Singh D., Kuckling D., Koul V., Choudhary V., Adler H.J., Dinda A.K., *European Polymer Journal* 44, 2008, 2962.
254. Lemon B.I., Crooks R.M., *Journal of the American Chemical Society* 122, 2000, 12886.
255. Sooklal K., Hanus L.H., Ploehn H.J., Murphy C.J., *Advanced Materials* 10, 1998, 1083.
256. Moffitt M., Eisenberg A., *Chemistry of Materials* 7, 1995, 1178.
257. Ostrander J.W., Mamedov A.A., Kotov N.A., *Journal of the American Chemical Society* 123, 2001, 1101.
258. Caruso F., Spasova M., Susha A., Giersig M., Caruso R.A., *Chemistry of Materials* 13, 2001, 109.
259. Nolan C.M., Reyes C.D., Debord J.D., Garcia A.J., Lyon L.A., *Biomacromolecules* 6, 2005, 2032.
260. Kim J., Serpe M.J., Lyon L.A., *Journal of the American Chemical Society* 126, 2004, 9512.
261. Satchi-Fainaro R., Duncan R., *Polymer therapeutics II : polymers as drugs, conjugates, and gene delivery systems*, Springer, Berlin, New York, 2006.
262. Satchi-Fainaro R., Duncan R., *Polymer Therapeutics I: polymers as drugs, conjugates and gene delivery systems*, Springer, Berlin, New York, 2006.
263. Duncan R., *Nature, Reviews Cancer* 6, 2006, 688.
264. Pimm M.V., Perkins A.C., Strohal J., Ulbrich K., Duncan R., *Journal of Drug Targeting* 3, 1996, 375.
265. Schoenmakers R.G., Van De Wetering P., Elbert D.L., Hubbell J.A., *Journal of Controlled Release* 95, 2004, 291.
266. Bae Y.H., Okano T., Kim W.S., *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* 28, 1990, 923.
267. Akkas P., Sari M., Sen M., Guven O., *Radiation Physics and Chemistry* 55, 1999, 717.

- 
268. Peppas N.A., Keys K.B., Torres-Lugo M., Lowman A.M., *Journal of Controlled release* 62, 1999, 81.
269. Kim S.W., Bae Y.H., Okano T., *Pharmaceutical Research* 9, 1992, 283.
270. Gehrke S.H., Palasis M., Akhtar M.K., *Polymer International* 29, 1992, 29.
271. Antonsen P.K., Bohnert L.J., Nabeshima Y., Sheu S., Su S.X., Hoffman S.A., *Biomaterial Artificial Cells and Immobilization Biotechnology* 21, 1993, 1.
272. Gupta P., Vermani K., Garg S., *Research Focus, Reviews* 7, 2002, 569.
273. Ranga Rao K.V., Padmalatha K.D., *International Journal of Pharmaceutics* 48, 1988, 1.
274. Ganta S., Devalapally H., Shahiwala A., Amiji M., *Journal of Controlled Release* 126, 2008, 187.
275. Torchilin V.P., *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 2006, 1532.
276. Daglar B., Ozgur E., Corman M.E., Uzund L., Demirel G.B., *RSC Advances* 4, 2014, 48639.
277. Zagar T.M., Higgins E., Miles F., Vujaskovic Z., Dewhirst M.W., Clough R.W., Prosnitz L.R., Jones E., *Radiotherapy and Oncology* 97, 2010, 535.
278. Kim B., Peppas N.A., *Polymer* 44, 2003, 3701.
279. Ichikawa H., Peppas N.A., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67, 2003, 609.
280. Lowman A.M., Morishita M., Kajita M., Nagai T., Peppas N.A., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88, 1999, 933.
281. Peppas N.A., Wood K.M., Blanchette J.O., *Expert Opinion on Biological Therapy* 4, 2004, 881.
282. Morishita M., Goto T., Peppas N.A., Joseph J.I., Torjman M.C., Munsick C., Nakamura K., Yamagata T., Takayama K., Lowman A.M., *Journal of Controlled Release* 97, 2004, 115.
283. Torres-Lugo M., Garcia M., Record R., Peppas N.A., *Journal of Controlled Release* 80, 2002, 197.
284. Torres-Lugo M., Peppas N.A., *Journal of Nanoparticle Research* 4, 2002, 73.
285. Robinson D.N., Peppas N.A., *Macromolecules* 35, 2002, 3668.
286. Donini C., Robinson D.N., Colombo P., Giordano F., Peppas N.A., *International Journal of Pharmaceutics* 245, 2002, 83.
287. Foss A.C., Goto T., Morishita M., Peppas N.A., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57, 2004, 163.
288. LaVan D.A., Lynn D.M., Langer R., *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 2002, 77.
289. Murthy N., Xu M.C., Schuck S., Kunisawa J., Shastri N., Frechet J.M.J., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2003, 4995.
290. Nayak S., Lee H., Chmielewski J., Lyon L.A., *Journal of the American Chemical Society* 126, 2004, 10258.
291. Soppimath K.S., Tan D.C.W., Yang Y.Y., *Advanced Materials* 17, 2005, 318.
292. Das M., Mardyani S., Chan W.C.W., Kumacheva E., *Advanced Materials* 18, 2006, 80.
293. Ostergaard H., Tachibana C., Winther J.R., *The Journal of Cell Biology* 166, 2004, 337.
294. Kommareddy S., Amiji M., *Bioconjugate Chemistry* 16, 2005, 1423.
295. Kommareddy S., Amiji M., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96, 2007, 397.
296. Kommareddy S., Amiji M., *Nanomedicine* 3, 2007, 32.
297. Rehor A., Schmoekel H., Tirelli N., Hubbell J.A., *Biomaterials* 29, 2008, 1958.

- 
298. Rehor A., Hubbell J.A., Tirelli N., *Langmuir* 21, 2005, 411.
299. Zhu M.Q., Wang L.Q., Exarhos G.J., Li A.D.Q., *Journal of the American Chemical Society* 126, 2004, 2656.
300. Wang C., Flynn N.T., Langer R., *Advanced Materials* 16, 2004, 1074.
301. Reese C.E., Mikhonin A.V., Kamenjicki M., Tikhonov A., Asher S.A., *Journal of the American Chemical Society* 126, 2004, 1493.
302. Suzuki A., Tanaka T., *Nature* 346, 1990, 345.
303. Galus Z., *Teoretyczne podstawy elektroanalizy chemicznej*, PWN, Wydanie drugie zmienione, Warszawa, 1977.
304. Pecora R., *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy* Springer Science & Business Media 1985.
305. Berne B.J., Pecora R., *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physic* Courier Dover Publications 2000.
306. Dalgleish D.G., Hallet F.R., *Food Research International* 28, 1995, 181.
307. Kelsall R.W., Hamley I.W., Geoghegan M., *Nanotechnologie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008.
308. Kurzydłowski K., Lewandowska M., *Nanomateriały inżynierskie – konstrukcyjne i funkcjonalne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010.
309. Barbacki A., *Mikroskopia elektronowa*, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, Poznań, 2003.
310. Gilewska G., *Przydatność różnych technik obrazowania struktur biologicznych wykorzystujących elektronowy mikroskop skaningowy*, Prace instytutu elektrotechniki, zeszyt 244, 2010.
311. de Graef M., *Introduction to conventional transmission electron microscopy*, Cambridge University Press, 2003.
312. Cygański A., *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, Wydawnictwa Naukowo – Techniczne, Warszawa, 2002.
313. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 2004.
314. Galaev I., Mattiasson B., *Smart Polymers, Applications in Biotechnology and Biomedicine*, CRC Press, New York, 2008.
315. Hertle Y., Hellweg T., *Journal of Materials Chemistry B* 1, 2013, 5874.
316. Kudaibergenov S.E., Nurajec N. and Khutoryanskiy V., *Soft Matter* 8, 2012, 9302.
317. Hulanicki A., *Reakcje kwasów i zasad w chemii analitycznej*, PWN, Warszawa, 1979.
318. Lide D.R., *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, New York, 1997.
319. Kokufuta E., *Langmuir* 21, 2005, 10004.
320. Demosthenous E., Hadjiyannakou S.C., Vamvakaki M., Patrickios C.S., *Macromolecules* 35, 2002, 2252.
321. Sovago I., Kiss T. and Gergely A., *Pure and Applied Chemistry* 65, 1993, 1029.
322. Berthon G., *Pure and Applied Chemistry* 67, 1995, 1117.
323. Kiss T., Sovago I., Gergely A., *Pure and Applied Chemistry* 63, 1991, 597.

- 
324. Rimbu G.A., Stamatini I., Jackson C.L., Scott K., *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 8, 2006, 670.
325. Oliveira M.M., Castro E.G., Canestraro C.D., Zanchet D., Ugarte D., Roman L.S., Zarbin A.J.G., *The Journal of Physical Chemistry B* 110, 2006, 17063.
326. Plonska-Brzezinska M.E., Mazurczyk J., Palys B., Brezko J., Lapinski A., Dubis A.T., Echegoyen L., *Chemistry – A European Journal* 18, 2012, 2600.
327. Ansari R., Price W.E., Wallace G.G., *Polymer* 37, 1996, 917.
328. Bartlett II R.L., Medow M.R., Panitch A., Seal B., *Biomacromolecules* 13, 2012, 1204.
329. Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D., *Journal of Nutrition* 134, 2004, 489.
330. Bauhuber S., Hozsa C., Breunig M., Gopferich A., *Advanced Materials* 21, 2009, 3286.
331. Saito G., Swanson J.A., Lee K.D., *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 2003, 199.
332. Meng F., Hennink W.E., Zhong Z., *Biomaterials* 30, 2009, 2180.
333. Ding J., Chen J., Li D., Xiao C., Zhang J., He C., Zhuang X., Chen X.J., *Journal of Materials Chemistry B* 1, 2013, 69.
334. Kice J. L., Senning A., Dekker M., *Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry*, New York, 1971.
335. Zunino F., Capranico G., *Anti-Cancer Drug Design* 5, 1990, 307.
336. Ferrazzi E., Woynarowski J.M., Arakali A., Brenner D.E., Beerman T.A., *Cancer Communications* 3, 1991, 173.